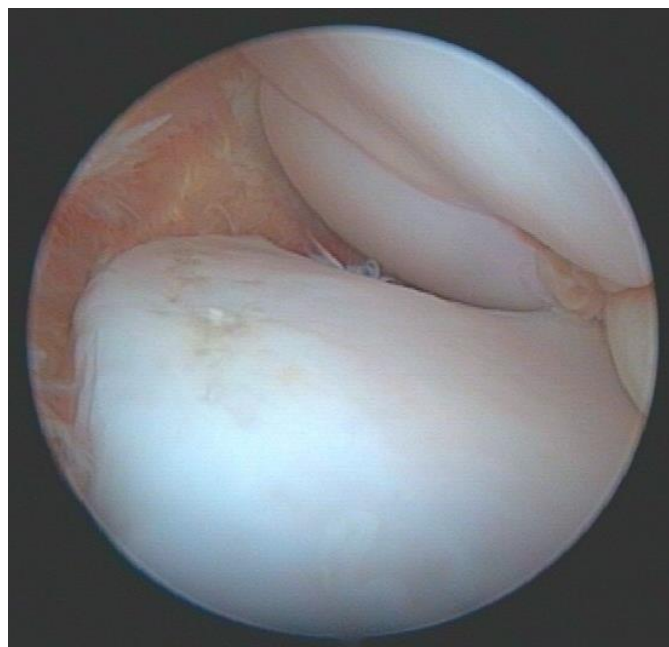


# Inflammationsmarkörer i serum och synovia från hästar med ledskada

*Emma Lassa*



*Uppsala  
2014*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN: 1652-8697  
Examensarbete 2014:43*



# Inflammationsmarkörer i serum och synovia från hästar med ledskada

## Inflammatory markers in serum and synovia from horses with joint pathology

*Emma Lassa*

**Handledare:** Cecilia Ley, Institutionen för Biomedicin och Veterinär  
Folkhälsovetenskap

**Biträdande handledare:** Stina Ekman, Institutionen för Biomedicin och Veterinär  
Folkhälsovetenskap  
Maria Löfgren, Institutionen för Biomedicin och Veterinär  
Folkhälsovetenskap

**Examinator:** Carina Ingvast-Larsson, Institutionen för Biomedicin och Veterinär  
Folkhälsovetenskap

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp  
**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E  
**Kurskod:** EX0751

**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2014

**Fotograf titelsida:** Bengt Ronéus. Interkarpalled med synovit och broskerosion

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2014:43

**ISSN:** 1652-8697

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Osteoartrit, high mobility group box protein 1, matrix metalloproteinases 13, interleukin 1 $\beta$

**Key words:** Osteoarthritis, high mobility group box protein 1, matrix metalloproteinases 13, interleukin 1 $\beta$ , equine



## SAMMANFATTNING

Hälta är idag den vanligaste anledningen till sjukdom hos svenska hästar och den vanligaste orsaken till hälta är osteoartrit (OA). Ställandet av diagnosen OA kommer ofta för sent så att irreversibla ledskador redan hunnit uppstå vilket gör det av yttersta betydelse att förbättra diagnostiken inom området. OA kan uppstå på flera olika sätt; akut trauma mot leden, intraartikulära frakturer, repetitivt trauma, skada på mjukdelar som orsakar en instabilitet i leden med flera. Förenklat kan OA orsakas till följd av en normal belastning på en onormal led eller onormal belastning på en normal led. Oavsett orsak ses skador på ledbrösket och beroende på hur utvecklad OA är kan röntgenförändringar ses, vilka avspeglar ett dåligt broskstatus. OA kan betraktas som en inflammatorisk ledsjukdom där flera ledkomponenter bidrar till inflammationen, bland annat producerar både synoviocyterna och kondrocyterna inflammationsmediatorer.

I sökandet efter en bättre diagnostik för OA undersöks möjligheten att med hjälp av biomarkörer för inflammatoriska och vävnadsnedbrytande processer i synovia och blod erhålla en tidig och korrekt diagnostik. I den här studien undersöktes med hjälp av ämnesspecifika ELISA cytokinerna interleukin (IL)-1 $\beta$ , high mobility group box protein (HMGB)-1 och enzymet matrix metalloproteinaser (MMP)-13, vilka alla kan vara av betydelse i sjukdomsprocessen vid OA. Hypoteserna för arbetet var att förhöjda koncentrationer av IL-1 $\beta$ , HMGB-1 och aktivt MMP-13 kan ses i synovia och serum vid förekomst av olika typer av patologiska ledförändringar och ju gravare makroskopiska patologiska ledförändringar desto högre nivåer av IL-1 $\beta$ , HMGB-1 och aktivt MMP-13 kommer att kunna påvisas i synovian. Vidare var hypotesen att nivåerna av IL-1 $\beta$ , HMGB-1 och aktivt MMP-13 i synovia och serum kommer att vara korrelerade.

Fjorton patienthästar ingick i studien och sammanlagt erhöles synovia från 24 kot- och karpalleder i samband med artroskopi. Koncentrationer av IL-1 $\beta$ , HMGB-1 och aktivt MMP-13 analyserades i synovia och blod med hjälp av ELISA och förekomst av typ och grad av ledskador noterades under artroskopi. Synovian analyserades även med avseende på antal leukocyter. Aktivt MMP-13 kunde inte detekteras i några patientprover och IL-1 $\beta$  detekterades bara i prov från en häst. HMGB-1 detekterades i 20 synoviaprover och 12 serumprover, och koncentrationen av HMGB-1 i synovia korrelerade signifikant med antal leukocyter i synovia. Koncentrationen av HMGB-1 i synovia var ofta högre om synovit eller fraktur påvisades makroskopiskt, men statistisk signifikans förelåg ej. Inte heller sågs statistisk skillnad i HMGB-1 koncentrationer i synovia beroende på förekomst eller inte av ledbröskerosion, slipfårar i ledbrösket eller osteokondrala fragment utan kliniska symtom. Ingen signifikant korrelation mellan nivå av HMGB-1 i serum och synovia kunde hittas, även om koncentrationerna i synovia oftare låg högre än i serum. Materialet var för litet för att kunna undersöka om det fanns en statistisk korrelation mellan grad av ledskada och koncentration av HMGB-1.

Sammanfattningsvis har studien inte kunnat visa att IL-1 $\beta$  eller aktivt MMP-13 kan användas för att diagnostisera patologiska ledförändringar. Däremot att det är möjligt att HMGB-1 kan

användas som biomarkör för ledsador med framför allt ett inflammatoriskt inslag. Fortsatta studier behövs för att vidare undersöka potentialen för HMGB-1 som biomarkör för OA.

## SUMMARY

Lameness is the most common cause of disease in Swedish horses, and the most common cause of lameness is osteoarthritis (OA). Diagnosing OA often comes too late in the disease process so that irreversible damage in the joint has already occurred. Therefore it is crucial to improve the diagnostic methods in the area. There are several ways in which OA can arise; acute trauma, intraarticular fractures, repetitive trauma and damage to the soft tissue that creates an instability in the joint to name a few. The causes of OA can be summarized as normal use of an abnormal joint or abnormal use of a normal joint. Regardless of the cause the same type of changes can be seen within the articular cartilage. Depending of the stage of OA radiografic changes can be detected, but these poorly reflect early changes in the cartilage. OA can be considered an inflammatory joint disease where several of the different tissues of the joint contribute to inflammation. For example both the synoviocytes and the chondrocytes produce inflammatory mediators.

In search for better diagnostic tools for early OA detection, biomarkers may be considered. Such biomarkers could be substances that can be tested for in synovial fluid or serum. In this project the cytokines interleukin (IL)-1 $\beta$ , high mobility group box protein (HMGB)-1 and the enzyme matrix metalloproteinase (MMP)-13 were investigated. These substances may all be involved in the disease process of OA. The hypotheses of the study were that increased concentrations of IL-1 $\beta$ , HMGB-1 and active MMP-13 in synovial fluid and serum are associated with the presence and grade of joint lesions. Furthermore, synovial fluid concentrations of IL-1 $\beta$ , HMGB-1 and active MMP-13 will be correlated to levels in serum.

Fourteen patient horses were included in the study and 24 fetlock and carpal joints were sampled during arthroscopy. Serum and synovial fluid samples were analyzed with specific ELISAs for IL-1 $\beta$ , HMGB-1 and active MMP-13 concentrations, and pathological changes in joints were recorded and graded during arthroscopy. Leukocyte counts in synovial fluid were also determined. Active MMP-13 was not detected, and IL-1 $\beta$  was only detected in samples from one horse. HMGB-1 was detected in 20 synovial fluid samples and 12 serum samples, and concentrations of HMGB-1 in synovial fluid correlated with synovial fluid leukocyte counts. The concentration of HMGB-1 was often higher in samples from joints with presence of synovitis and fracture but this was not statistically significant. No statistical difference in HMGB-1 concentrations could be shown in synovial fluid in regard to presence of cartilage erosions, wear lines or osteochondral fragments without clinical symptoms. Although there was a tendency for concentrations of HMGB-1 to be higher in synovial fluid than in serum there was no statistical correlation between synovial and serum HMGB-1 concentrations. The graded groups of joint lesions were too small to enable calculations regarding correlations between grade of lesions and concentrations of HMGB-1.

To conclude, this study has not been able to show that synovial fluid or serum concentrations of IL-1 $\beta$  or active MMP-13 can be used as diagnostic tools to detect joint lesions. However, there is a possibility that synovial fluid concentrations of HMGB-1 can be used as an

indicator of joint lesions, particular those lesions with an inflammatory component. Further studies are required for evaluating HMGB-1 as a biomarker for OA.



## Innehållsförteckning

Inledning.....	1
Syfte.....	2
Hypotes .....	2
Litteraturoversikt.....	3
Synovialled .....	3
Metakarpofalangealled/metatarsofalangealled .....	4
Karpus.....	5
OA.....	5
Biologiska markörer .....	8
IL-1 $\beta$ .....	8
MMP-13.....	9
HMGB-1 .....	10
Material och metoder .....	11
Resultat.....	14
Diskussion.....	21
Konklusion .....	24
Tack .....	25
Litteraturförteckning .....	26
Bilaga 1 .....	1
Bilaga 2 .....	2

## INLEDNING

Hälta är idag den vanligaste orsaken till sjukdom hos häst. I en svensk studie från 2005 har 37 % av hästarna som söker veterinärvård en specifik leddiagnos och så många som 62 % har problem i rörelseapparaten (Penell *et al.*, 2005). Samma forskargrupp visade också att sjukdomar i leder är den vanligaste orsaken till avlivning (Egenvall *et al.*, 2006). Av sjukdomarna i rörelseapparaten är osteoartrit (OA) i kotleden den absolut vanligaste hos svenska hästar (Penell *et al.*, 2005). OA är en välfärdsfråga för människor då det är en smärtsam sjukdom som leder till nedsatt livskvalité (Umlauf *et al.*, 2010) och då sjukdomen hos häst uppvisar liknande symtom är det rimligt att dra slutsatsen att det också är en djurvälfärdsfråga (de Grauw, 2011).

Många gånger finns också en ekonomisk aspekt av OA då diagnostik, behandling och rehabilitering innebär stora kostnader för djurägaren. Om det är en tävlande travhäst som drabbas och djurägaren går miste om insprungna pengar eller en ridskolehäst som inte kan ingå i verksamheten kan de ekonomiska konsekvenserna bli stora. Ett stort problem med OA är att det många gånger dröjer för lång tid mellan uppkomst och upptäckt av sjukdomen vilket medför att skadorna vid diagnosställande redan har blivit svårbehandlade, och därmed dyra, eller irreversibla (Mobasher, 2012; Cruz & Hurtig, 2008; Helminen *et al.*, 2000).

Hälta hos häst är också en etisk fråga då det finns risk att sporthästar pressas att prestera på en hög nivå för att sedan om de blir sjuka slås ut och ersättas med en frisk häst. Detta istället för att hästen ges tiden och pengarna som krävs för att bli frisk, det vill säga diagnostisering, behandling, konvalescens och rehabilitering. När hälta associerat med OA uppstår har leden ofta redan blivit så pass påverkad att den inte är enkel att åtgärda (Mobasher, 2012; Helminen *et al.*, 2000).

Om det skulle vara möjligt att med ett enkelt diagnostiskt test se om en häst lider av preklinisk OA och därmed möjliggöra en tidigt insatt behandling skulle det revolutionera hästmedicin och hästhållning i världen. Detta då tidigt insatta åtgärder skulle minska skadorna i leden och framförallt skador på ledbrösket som har dålig läkningsförmåga (Goldring & Goldring, 2007). Troligen skulle förbättrad tidig diagnostik innebära att färre hästar slås ut på grund av hälta. Upptäckt och behandling av OA innan det blivit irreversibla skador på brosket skulle troligen också innebära färre återfall i sjukdomen eftersom övriga delar av leden har större läkningsförmåga än ledbrösket. Ungefär 30 % av hästarna som sökt veterinärvård söker igen efter cirka ett år (ej specificerad diagnos) (Egenvall *et al.*, 2005) och om de irreversibla ledskadorna minskar borde också recidivriskerna minska. I jakten på ett sådant diagnostiskt test har flertalet studier gjorts på de cytokiner som anses vara involverade i inflammationsprocessen vid OA (Chiaradia *et al.*, 2012; de Grauw *et al.*, 2011; Busschers *et al.*, 2010; Kamm *et al.*, 2010; Bertone *et al.*, 2001; Brama *et al.*, 1998).

Förhoppningen är att hitta en eller flera biomarkörer som korrelerar med det tidiga stadiet av OA och som är specifika för de patologiska processer som då uppstår. En av utmaningarna är att OA är en komplicerad sjukdom som kan uppstå på flera sätt och att det är många cytokiner

och enzymer som samverkar på ett komplicerat och inte helt utrett sätt. Därför har inga guldstandard markörer hittats trots att forskning på biomarkörer pågått i många år.

## **Syfte**

I den här studien undersöktes koncentrationerna av cytokinerna interleukin (IL)-1 $\beta$ , high mobility group box protein (HMGB)-1 och den aktiva formen av enzymet matrix metalloproteinas (MMP)-13 i ledvätska (synovia) och blod hos hästar med ledskada. Dessa ämnen är involverade i OA och är därför potentiella biomarkörer för sjukdomen. Syftet med studien var att undersöka om ämnena är lämpliga att använda som biomarkörer för ledskada och om koncentrationerna i ledvätska var korrelerade till grad av patologiska förändringar i leden och till uppmätta koncentrationer i blod.

## **Hypotes**

Hypoteserna för arbetet var att förhöjda koncentrationer av IL-1 $\beta$ , HMGB-1 och aktivt MMP-13 kan ses i synovia och serum vid förekomst av olika typer av patologiska ledförändringar och ju gravare makroskopiska patologiska ledförändringar desto högre koncentrationer av IL-1 $\beta$ , HMGB-1 och aktivt MMP-13 kommer att kunna påvisas i synovian. Vidare var hypotesen att koncentrationerna av IL-1 $\beta$ , HMGB-1 och aktivt MMP-13 i synovia är korrelerade till koncentrationer i serum.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Synovialled

Hästens extremitetsleder är synovialleder och liknar varandra i sin grundläggande uppbyggnad. En led kan betraktas som ett organ där alla delar inverkar och påverkar varandra vilket har avgörande betydelse för både den fysiologiska funktionen och patologiska processer. I leden ingår följande delar; skelett med framförallt det subkondrala benet, hyalint ledbrusk, synovialmembran, ledkapsel, ligament och ledhåla med synovia (McIlwraith, 2011).

Ledbrusket delas upp i fyra zoner som skiljer sig med avseende på innehåll av kondrocyter, extracellulärt matrix (ECM) och hur kollagen fibrillerna är orienterade. Brusket närmast ledhålan är den ytliga zonen, en del av den ytliga zonen kallas lamina splendens vilken inte utgörs av celler utan av kollagenfibriller och polysackarider. Lamina splendens utgör en barriär mellan brusket och synovian och hindrar passage av större molekyler (Buckwalter *et al.*, 2005) och bidrar till ledens smörjning genom produktion av lubricin (Kumar *et al.*, 2001). Zonen närmast skelettet är den kalcifierade zonen vilken förankrar brusket i skelettet. Ledbrusket har ingen direkt blodförsörjning, lymfförsörjning eller nervförsörjning utan tillförsel av näring och bortförsel av slaggprodukter sker med hjälp av diffusion mellan bruskets extracellulära matrix (ECM) och synovian (Caron, 2011). Ledbrusk består till mindre än 2 % av kondrocyter vilka ansvarar för produktionen av beståndsdelarna i ECM (de Grauw, 2011). Kondrocyternas metabolism påverkas av både mekaniska faktorer och av inre och yttre kemiska faktorer och kondrocyterna kan både bygga upp och degradera ECM. ECM består huvudsakligen av kollagen typ II, proteoglykaner, glykoproteiner och vatten. Kollagen utgör 65-80% av bruskets volym och bildar ramverket i ECM. Kollagen utsöndras som prokollagen som sedan omvandlas till kollagen. Prokollagen återfinns i ECM till större del i unga hästar och i mindre grad hos vuxna hästar (McIlwraith, 2011). Det finns också en mindre del andra typer av kollagen än typ II som bland annat bidrar med att öka stabiliteten i det kollagena ramverket. Kollagenet bidrar till bruskets stabilitet genom att öka draghållfastheten. Draghållfastheten är störst ytligt i brusket och minskar djupare ner vilket innebär att om en skada går igenom den ytliga hållfastadelen så blir ledbrusket mindre draghållfast (McIlwraith, 2011). Den andra stora byggstenen i brusk är proteoglykaner som består av protein och glukosaminoglykaner (GAG). De vanligaste GAG är kondrotin-6-sulfat och keratan sulfat (McIlwraith, 2011) vilka båda innehåller negativt laddade grupper vilket gör att GAG repellerar varandra och attraherar vatten. Proteoglykanerna binder till hyaluronsyra och bildar på så vis stora aggregat, benämnda aggregat. Aggregat är utspritt mellan kollagen II fibrillerna och bidrar med bruskets hållfasthet för kompression samt förmågan att fördela vikt genom dess förmåga att attrahera vatten (Caron, 2011). Glykoproteiner har olika funktion i ECM, vissa fungerar som länkprotein mellan hyaluronsyra och proteoglykaner eller hjälper kondrocyter att binda till typ II kollagen (McIlwraith, 2011).

Synovialmembranet består av intima och subintima och är inget äkta membran då det saknar ett basalmembran. Intiman är ett lager av synoviocyter som är 1-4 celler tjockt (McIlwraith, 2011). Synoviocyterna är antingen typ B celler som härstammar från fibroblaster och som producerar viktiga molekyler som hyaluronsyra och kollagen, eller typ A celler som härstammar från makrofager och utgör 10-20% av synoviocyterna och som huvudsakligen

fagocyterar debris. Vid hårt arbete eller vid inflammation ändras proportionerna mellan typ A och B celler så att typ A cellerna dominerar, men det blir även en proliferation av typ B celler (Bertone, 2004b). Synoviocyterna kan syntetisera en rad olika mediatorer som är involverade vid OA, exempelvis interleukiner (Caron, 2011). Subintiman består av bindväv och är rikligt kärlförsörjd med ett väl utvecklat kapillärt nätverk för att underlätta utbyte av näring och slaggprodukter med synovian (Caron, 2011).

Synovia (ledvätska) fyller ledhålan och dess viktigaste uppgift är att förflytta näring och slaggprodukter mellan ledbrosket och kapillärerna i synovialmembranet (Frisbie, 2012). Synovia är ett ultrafiltrat av plasma med tillsats av hyaluronsyra och andra proteiner som synoviocyterna tillverkar. Synovia innehåller normalt ett lågt antal celler, under 500 celler per  $\mu\text{L}$ , och de flesta celler är mononukleära (de Grauw, 2011). Förutom att förflytta näring så förflyttar synovian också olika sorters mediatorer, exempelvis IL-1 $\beta$  och MMP, mellan kondrocyterna och synoviocyterna både i normalt fysiologiskt stadiet och vid inflammationstillstånd.

Subkondralt ben består av kortikalt ben och har en viktig del i ledens funktion genom att det fungerar stötdämpande och bidrar med strukturellt stöd åt ledbrosket. Benet anpassar sig till den belastningsgrad leden utsätts för och vid överdriven eller onormal belastning kan skleros ses med röntgen (Cruz & Hurtig, 2008). Skleros gör att benet blir hårdare men också skörare och mindre lämpat för stötdämpning (Cruz & Hurtig, 2008). Till skillnad från ledbrosket är det subkondralt benet blodförsörjt och innerverat (McIlwraith, 2011).

Ledkapseln består av bindväv med hög andel kollagen typ I fibrer vilket gör att ledkapseln kan bidra med stabilitet åt leden. Infästningen till benet sker gradvis genom att bindväven först blir delvis mineraliserad och sedan fäster in i benet. Detta gör att krafter fördelas över ett större område och minskar risken för skada. Ledernas kollateralligament är ofta inkorporerade i ledkapseln (McIlwraith, 2001).

### ***Metakarpofalangealled/metatarsfalangealled***

Metakarpofalangealled/metatarsfalangealled, kotled, är den led hos svenska hästar som vanligen drabbas av sjukdom (Penell *et al.*, 2005). Kotleden är en gångjärnsled. Det är den led som har störst rörelseomfång, från 120° extension till 120° flexion, vilket gör den utsatt för förslitningsskador (Bertone, 2004a). Leden har två huvudfunktioner; att bära hästens vikt under isättningsfasen och belastningsfasen i rörelse samt att absorbera största delen av stöten som uppstår när hoven sätts i marken (Copelan & Bramlage, 1983). Kotleden består förutom av metakarpalben III (MCIII) eller metatarsalben III (MTIII) och proximala falangen (P1) också av kotsenbenen. Kotsenbenen bidrar med en större ledyta vid maximal extension. Gaffelbandsgrenarna fäster in till kotsenbenen och fungerar som en kraftig stödjevävnad till kotleden och förhindrar en



Figur 1. Hyperextension i kotleden. Foto: *Horse in Motion*, Eadweard Muybridge.

översträckning vid extension (figur 1). En sagittal styrlist på MCIII/MTIII och en sagittal ränna i P1 samt kollateralligament på medial och lateralsidorna om leden tillåter endast rörelse i kraniokaudal riktning. På grund av det stora rörelseomfånget är kotledens ledkapsel rymlig. Den sträcker ut sig i flera fickor vilka alla kommunicerar med varandra vilket gör att vid skada påverkas hela leden. Vid träning i höga farter eller vid träning så att stödjevävnaderna blir uttröttade kan skador på grund av överextension uppstå, exempelvis fissurer eller frakturer på kotsenbenen eller frakturer dorsalt i leden (Copelan & Bramlage, 1983). Traumatisk synovit och kapsulit samt OA är andra tillstånd som är vanliga i kotleden och som vanligen uppkommer på grund av frekvent användningen av kotleden under hög belastning och höga farter (Bertone, 2004a).

### **Karpus**

Karpus består av tre leder som samverkar med varandra, radiokarpalleden (RC), interkarpalleden (IC) och karpometakarpalleden (CM). IC och CM kommunicerar med varandra medan RC har ett eget synovialt utrymme, dock kan bedövningsmedel diffundera mellan RC och IC vilket är viktigt att tänka på vid diagnostiska anestasier (Gough *et al.*, 2002). Karpus består förutom av radius och metakarpus också av sju eller åtta mindre karpalben som ligger i två rader. Övre raden innefattar radialis (os carpi radiale), intermediare (os carpi intermedium), ulnaris (os carpi ulnare) och ärtbenet (os carpi accessorium). Undre raden består av karpalben II, III och IV och ibland även karpalben I. Benen hålls på plats av mediala och laterala interkarpalligament, kollateralligament, ledkapsel och palmara karpalligament (Ruggles, 2012). De olika lederna i karpus har olika mekanism; RC har en roterande funktion medan IC har en gångjärnsfunktion. CM, som inte öppnas vid flexion, har en glidande funktion vid belastning. Skador i karpus uppkommer vanligen vid upprepad träning i hög fart, ex galopp (figur 2.) eller trav (Bramlage, 1983). Denna typ av träning medför att mjukvävnaderna blir uttröttade och en överextension av leden uppstår, vilket gör att de dorsala kanterna på benen slår i varandra. Till exempel är skador i IC på radialis och tredje karpalbenet vanligt hos hästar som tävlar i trav medan hästar som tävlar i galopp kan ha skador i RC kraniolateralt på radius (Bramlage, 1983).



Figur 2. *Hyperextension i karpus. Foto: Horse in Motion, Eadweard Muybridge.*

### **OA**

OA är egentligen ingen egen sjukdom i sig utan ledens respons på skada. OA kan karakteriseras som en obalans i ledens metabolism som leder till en störning i broskets ECM vilket obehandlat leder till makroskopiska skador (Loeser *et al.*, 2012). De makroskopiska

förändringar som ses i leder drabbade av OA är; förlust av ledbrosk, förtätat subkondralt ben, synovit, förtjockning av ledkapseln och påverkan på ligament (Loeser *et al.*, 2012). Radiologiskt kan man se benskleros, osteofyter och subkondrala bencystor. Trots många års forskning är den exakta vetenskapen om de mekaniska och biokemiska faktorer och deras interaktioner som leder till OA inte fullständigt klarlagd (Caron, 2011). Ett flertal olika skador som drabbar leden kan leda till OA och OA kan också uppstå utan känd predisponerande skada. Etiologierna kan delas upp i två grupper utifrån de två huvudmekanismerna bakom OA nämligen onormal belastning på en normal led eller normal belastning på en onormal led (Goldring & Goldring, 2007).

Traditionellt har OA inte ansetts vara en inflammatorisk sjukdom då bland annat antalet vita celler i synovian är lågt och utseendet i leden inte är typiskt för inflammation (brosk som inte är kärlförsörjt kan inte rodna). Dock finns de övriga tecknen på inflammation som smärta, funktionsnedsättning, svullnad och värme. I synovia från leder med OA återfinns också de viktigaste cytokinerna vid inflammation IL-1 $\beta$  och tumör nekros faktor (TNF)- $\alpha$  (Loeser *et al.*, 2012; Martel-Pelletier *et al.*, 1999). Därför är det nu allmänt ansett att OA har en inflammatorisk komponent som kan uppstå både som svar på annan skada eller vara det första steget till OA. Inflammation i leden leder till OA genom att det blir en frisättning av olika mediatorer och cytokiner som orsakar en förändring i kondrocytmetabolismen så att den ändras till att vara huvudsakligen katabol istället för anabol (Buckwalter *et al.*, 2005). Detta ger ett försämrat brosk som lättare skadas (de Grauw, 2011). Skador som kan orsaka OA är bland annat intraartikulära frakturer, osteokondrala chip frakturer, trauma mot leden eller skador på ligament eller senor som orsakar en instabilitet i leden. Alla skadorna leder till en ändrad metabolism i leden och frisättning av mediatorer och cytokiner som framkallar inflammation.

Buckwalter *et al.* har försökt att klargöra patogenesen som leder till OA och hur skadan sker (Buckwalter *et al.*, 2005). De delar in patogenesen i tre steg vilka inte separeras av tydliga gränser. Initialt sker en förändring eller skada i ledbroskets ECM. Därefter ses ett reparativt svar från kondrocyterna på skadan, men slutligen avstannar kondrocyternas försök att reparera skadan och en förlust av vävnad sker. Skadan i broskmatrixet tillsammans med fibrillering på ytan öppnar upp brosket och gör det mer genomsläppligt för vatten vilket ger det ett svullet utseende. En minskning av mängden proteoglykaner och aggregat, minskad längd på GAG samt instabilitet i ramverket av kollagen tillåter att vatteninnehållet ökar och gör brosket mer permeabelt för exempelvis stora molekyler. Det svullna brosket är skörare för mekanisk påverkan och det blir lätt skador djupare ner i brosket. Steg två börjar när kondrocyterna reagerar på en skada eller förändring i osmolaliteten och frisätter mediatorer för ett snabbt cellsvar. Cellsvaret är både anabolt, vilket medför att kondrocyterna prolifererar och tillverkar mer ECM, och katabolt, med en frisättning av kväveoxid som ger en ökad syntes av IL-1. IL-1 ger ett ökat uttryck av MMPs som degraderar ECM. Om det anabola svaret överstiger de katabola processerna kan vävnaden bli återställd eller åtminstone kan progressionen av OA stoppas. Om kondrocyterna inte lyckas återställa ECM minskar det anabola svaret succesivt och det blir en stegvis förlust av vävnad. Om inte de katabola reaktionerna kan hindras blir skadorna större och sprickorna i brosket sträcker sig ner till det subkondrala benet. Slutstadiet

är en led utan brosk på belastningsytorna med förtjockat nekrotiskt ben (Buckwalter *et al.*, 2005).

Onormal belastning på en normal led eller "wear and tear" hos tävlingshästar kan framkalla en anpassning i det subkondrala benet. Anpassningen innebär att benet blir tjockare för att klara belastningen vilket gör att dess stötdämpade funktion minskar. Detta ökar risken för kompressionsskada på brosket. I en studie bekräftades ett samband mellan förändringar i subkondralt ben och OA skador i ledbrosket (Lacourt *et al.*, 2012). Författarna menar att förändring i det subkondrala benet kan ge upphov till sprickor i det kalcifierade brosket, (som överför kraft mellan ledbrosket och skelettet), vilket orsakar en instabilitet i brosket och detta i sin tur leder till OA. De menar att detta är ett av sätten som repetitiva belastningar på leden kan leda till OA, och att fortsatt belastning på en led med OA medför en minskad bentäthet djupare ner i benet på grund av nedsatt hållfasthet. En annan studie visade att kontaktytan mellan ledbrosket i kotleden ökar med ökat tryck på leden och att det bara är vid mycket högt tryck som den dorsala delen av P1 kommer i kontakt med motstående ledytas brosk (Brama *et al.*, 2001). Författarna menar att brosket på den dorsala ytan (som normalt inte belastas) inte klarar av den belastning det utsätts för vid hoppning eller galopp, och att det därför är en biomekanisk orsak bakom skadorna i detta område. Det subkondrala benet kan också påverkas så att ossifieringen reaktiveras vilket leder till ett tunnare ledbrosk och ett hårdare subkondralt ben, vilket tillsammans predisponerar för skador på ledbrosket (Cruz & Hurtig, 2008). Huruvida förändringar i det subkondrala benet leder till OA på egen hand eller om det finns olika mekanismer som påverkar ledbrosk och skelett oberoende av varandra finns ingen konsensus. En forskargrupp visade att vissa hästar med grava skador på ledbrosket saknar förändringar i det subkondrala benet och tvärtom, att hästar med kraftiga förändringar i det subkondrala benet saknar skador på ledbrosket (Cruz & Hurtig, 2008). Författarna menar dock att remodelering av ben i närheten av ledbrosket kan påverka brosket genom frisättning av cytokiner eller enzymer. I leder med aktiv OA som bekräftats med artroskopi har en forskargrupp visat en positiv korrelation mellan graden av ledbroskada en biomarkör för benremodellering (Fuller *et al.*, 2001).

Kliniska tecken på OA är bland annat svullnad (galla) i leden, värme, smärta och nedsatt rörelseuttag (Buckwalter *et al.*, 2005). I de fall OA är bilateral kan nedsatt prestation eller ovilja att arbeta och ett kortare steg vara de tydligaste symtomen (Dyson, 2013). Radiologiskt ses osteofyter, benskleros och subkondrala cystor vid väl utvecklad OA, ibland kan även ett minskat ledutrymme ses (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

OA behandlas traditionellt intraartikulärt med glukokortikosterioder och/eller hyaluronsyra och/eller systemiskt med NSAID och/eller hyaluronsyra (Ekman, 2010; Goodrich & Nixon, 2006; Caron, 2005). Nyare och mer specifikt riktade medicinska behandlingsmetoder inkluderar behandling med IRAP (interleukin-1 receptor antagonist protein) för att motverka inverkan av IL-1 $\beta$  (Ekman, 2010; Smith & Clegg, 2007a; Frisbie, 2005). Kronisk synovit kan teoretiskt underhålla den inflammatoriska reaktionen med tanke på ledhinnans förmåga att producera cytokiner och enzymer, och synovektomi används som kirurgisk behandling för att avlägsna det proliferativa synovialmembranet (Smith & Clegg, 2007b).



## Biologiska markörer

En biologisk markör är definierat av The Biomarkers Definitions Working Group som någonting som mäts objektivt och är utvärderat som en indikator för normala fysiologiska processer, patologiska processer eller för ett farmakologiskt svar på en behandling (Atkinson *et al.*, 2001). Biomarkörer kan vara olika sorters parametrar, exempelvis anatomiska, fysiologiska, biokemiska eller molekylära vilka hör samman med en viss sjukdom och som kan mätas med olika metoder som bilddiagnostik eller laboratorieanalys. De biokemiska markörerna kan mätas i blod, serum, synovia eller urin. I dagsläget finns det ingen bra biokemisk markör för att upptäcka OA i ett tidigt stadium, övervaka sjukdomsprocessen eller utvärdera behandlingar (Mobasheri, 2012). Många olika faktorer påverkar biomarkörer som mäts i kroppsvätskor; metabolism och clearance påverkas av njurar och lever och andra faktorer som ålder, ras, narkos, operation och hur biomarkörerna samlas och förvaras måste också tas hänsyn till när biomarkörer analyseras (McIlwraith *et al.*, 2001). Synovia är den vätska som troligen återspeglar de fysiologiska och patologiska processerna i leden mest korrekt genom att den fungerar som medium mellan synovialmembran och ledbrosk (McIlwraith, 2005). Eftersom synovia produceras kontinuerligt av synoviocyterna ger synovian ett aktuellt värde för olika markörer (de Grauw, 2011).

### IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  (IL-1F2) är en cytokin som tillhör IL-1 familjen. Denna familj består av 11 olika medlemmar, vilka alla är involverade i inflammationsprocesser, och där några inducerar inflammation och några motverkar inflammation (Dinarello, 2009). IL-1 $\beta$  produceras framförallt i monocyter, makrofager, dendritiska celler, B lymfocyter och NK (mördar/natural killer) celler (Dinarello, 2009). Eftersom IL-1 $\beta$  är en potent inflammationsframkallande cytokin sker aktiveringen i flera steg varav alla inte är helt utredda.

Syntetisering av IL-1 $\beta$  börjar när TLR (toll-like receptor) aktiveras av PAMP (pathogen-associated molecular patterns) (Schroder & Tschopp, 2010). Detta aktiverar NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa beta) som då tillåter syntetisering av pro-IL-1 $\beta$ . Efter ytterligare aktivering i cellen av bland annat PAMP eller DAMP (danger/damage associated molecular patterns) klyver enzymet caspase-1 pro-IL-1 $\beta$  till IL-1 $\beta$  och IL-1 $\beta$  utsöndras från cellen (Strowig *et al.*, 2012).

IL-1 $\beta$  påverkar celler genom att binda till speciella receptorer som sitter på cellytan, IL-1R, speciellt IL-1R typ I. I leder som drabbats av OA uttrycker kondrocyterna fler IL-1R typ I och är också känsligare för stimuli av IL-1 $\beta$  då en lägre koncentration av cytokinet krävs för att cellerna ska producera bland annat MMPs som bryter ner ledbrosk (Martel-Pelletier *et al.*, 1992). Detsamma gäller för synoviocyterna, i leder med OA uttrycker de fler IL-1R typ I på cellytan än i friska leder (Sadouk *et al.*, 1995). Receptorerna är bundna till cellens yta men kan också förekomma fritt extracellulärt och fungerar då som en receptor antagonist genom att binda upp IL-1 $\beta$  (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

IL-1 $\beta$  bidrar till inflammation på flera olika sätt, bland annat påverkar det genuttryck och produktion av cyclooxygenase-2 (COX-2), fosfolipas-2A vilket i sin tur leder till en ökad produktion av prostaglandin-E2 (PGE2) och kväveoxid (NO) vilket resulterar i feber, ökad

smärtkänslighet, vasodilation och hypotension. IL-1 $\beta$  påverkar också infiltrationen av inflammatoriska celler från cirkulationen till vävnaden, bland annat genom att öka uttrycket av adhesionsmolekyler på mesenkymala celler och endotelceller (Dinarello, 2009). Möss med inducerad OA uppvisar lindrigare skador på ledbrösket om de genetiskt saknar IL-1 $\beta$  uttryck. Möss som inte uttrycker IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) utvecklar kronisk inflammatorisk polyartrit spontant. I lederna syns infiltration av inflammatoriska celler i synovialmembranet och periartikulärt, ökad osteoklastaktivitet och benerosion. Histologiskt liknar mössens leder humana leder som drabbats av reumatisk artrit (RA) (Dinarello, 2009). IL-1 $\beta$  orsakar en nedbrytning av GAG i ledbrösk möjligen genom att IL-1 $\beta$  också uppreglerar MMP-13 (Busschers *et al.*, 2010). Studier där IL-1 $\beta$  inhiberats visar att IL-1 $\beta$  är den cytokin som ansvarar för nedbrytning av ledbrösk (McIlwraith & Trotter, 2001).

### **MMP-13**

MMP-13 är ett enzym som framförallt bryter ner kollagen och klassificeras därför som ett kollagenas, kollagenase-3. Förutom att MMP-13 bryter ner kollagen typ II 5-10 gånger snabbare än MMP-1 (Umlauf *et al.*, 2010; Reboul *et al.*, 1996) kan enzymet också bryta ner flera andra matrixkomponenter (Tardif *et al.*, 2004) bland annat aggrecan (Martel-Pelletier & Pelletier, 1996). Under fosterutveckling hos människor återfinns MMP-13 i hypertrofiska kondrocyter och osteoklaster men senare i livet har MMP-13 hittats vid olika sjukdomar (Tardif *et al.*, 2004; Stahle-Backdahl *et al.*, 1997), några forskargrupper har också hittat MMP-13 i låga koncentrationer hos friska individer (Shlopov *et al.*, 1997; Martel-Pelletier & Pelletier, 1996). MMP-13 produceras av kondrocyter under inverkan av bland annat IL-1 $\beta$  (Busschers *et al.*, 2010) och uttrycket och syntetiseringen av MMP-13 är kraftigt förhöjt i leder med OA (Kamm *et al.*, 2010; Brama *et al.*, 1998; Reboul *et al.*, 1996). Brama *et al.* visade också att juvenila hästar (under ett år) uttrycker högre nivåer av MMP-13 i synovia än vuxna hästar (mellan fyra och trettio år) och menade att det beror på att unga hästar har en högre grad av metabolism i ledbrösket på grund av att de växer. Däremot påvisades inga förhöjda nivåer av MMP-13 i leder som drabbats av osteokondros (OC) trots att OA gav förhöjda nivåer vilket tyder på att OC och OA har olika patogenes. Rebouls studie visar också att synoviocyter i leder med OA inte uttrycker MMP-13 trots att de uttrycker MMP-1. Detta har dock flera senare studier motbevisat, bland annat Kamm *et al.* visade förhöjda MMP-13 nivåer i synoviocyter från hästar med OA (Kamm *et al.*, 2010). En annan studie visade att kondrocyterna närmast OA lesionen uttrycker mer MMP-13 än kondrocyterna i samma led men längre bort från lesionen (Shlopov *et al.*, 1997).

MMP-13 tillverkas som pro-enzym och måste klyvas för att bli aktivt. Många olika enzym kan klyva MMP-13, t.ex. plasmin, MMP-14 och MMP-2 (Visse & Nagase, 2003; Knauper *et al.*, 1996). Aktiviteten av MMP-13 regleras också av olika inhibitorer bland annat TIMP (tissue inhibitor of metalloproteases). TIMP inaktiverar MMP-13 genom att binda till den aktiva platsen på MMP-13 (Gomez *et al.*, 1997). TIMPs produceras av kondrocyter och av fibroblaster (Burrage *et al.*, 2006). Även om IL-1 $\beta$  har en stor inverkan på produktionen av MMP-13 kan kondrocyter frisätta MMP-13 även utan närvaro av IL-1 $\beta$  (Bougault *et al.*, 2013).

## HMGB-1

HMGB-1 är ett alarmin som fungerar som ett proinflammatoriskt cytokin i sin extracellulära funktion. Alarminer är proinflammatoriska proteiner som snabbt släpps ut från celler vid infektion eller inflammation. Dessa attraherar antigen-presenterande celler till platsen och aktiverar dessa samt andra delar av immunförsvaret (Pisetsky *et al.*, 2008). HMGB-1 är i första hand lokaliserat till cellkärnan, men kan också finnas i cytoplasman eller på cellytan. I cellkärnan har HMGB-1 både en strukturell funktion genom att binda till både DNA och nukleosomer, och en genreglerande funktion genom att ändra kromatinets struktur och reglera transkriptionsfaktorernas bindning till DNA (Pisetsky *et al.*, 2008). HMGB-1 frisätts extracellulärt av makrofager som utsätts för LPS (lipopolysackarider), TNF och IL-1 $\beta$  (Wang *et al.*, 1999). HMGB-1 frisätts även från nekrotiska celler vilket gör att HMGB-1 fungerar som en signalmolekyl till omkringliggande vävnad att en skada uppstått, och bidrar därmed till inflammation vid vävnadsnekros (Rovere-Querini *et al.*, 2004; Scaffidi *et al.*, 2002). Även dendritiska celler (DC) kan släppa ut HMGB-1 som då fungerar autokrint och aktiverar DC och gör DC till en effektivare antigen-presenterande cell (Pisetsky *et al.*, 2008). Extracellulärt utövar HMGB-1 sin funktion genom att binda till bland andra TLR 2 och 4 och RAGE (receptor of advanced glycation end products) (Park *et al.*, 2006; Kokkola *et al.*, 2005).

Vid bindning till receptorerna aktiveras bland annat NF- $\kappa$ B vilket gör att exempelvis makrofager producerar TNF, NO och IL-1 (Kokkola *et al.*, 2005; Pullerits *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2003; Kokkola *et al.*, 2002). HMGB-1 kan binda till immunostimulerande molekyler som exempelvis LPS eller IL-1 $\beta$  vilket ger en synergistisk effekt genom att både RAGE och TLR binds till samtidigt vilket ger en ökad effekt från båda. Dubbelbindningen kan orsaka en förlängd period av höga cytokinnivåer vid inflammation (Sha *et al.*, 2008; Youn *et al.*, 2008).

Flera olika studier visar att HMGB-1 är involverat i artrit. I friska leder finns HMGB-1 i cellkärnan i både kondrocyter och synoviocyter, medan i leder från möss med inducerad artrit återfinns HMGB-1 både i cytoplasman och extracellulärt (Kokkola *et al.*, 2002). I bovina leder med OA hittas HMGB-1 i cytoplasman hos kondrocyter och om det är grava OA förändringar även extracellulärt (Heinola *et al.*, 2010). Experiment på möss visade att HMGB-1 på egen hand kan orsaka synovit när det injiceras i en frisk led genom att aktivera NF- $\kappa$ B i makrofager vilket ger en ökad produktion av IL-1 $\beta$  (Pullerits *et al.*, 2003). I synovia från leder med RA har makrofagerna ett ökat uttryck av RAGE vilket gör att mer HMGB-1 kan binda till cellen som då producerar mer TNF- $\alpha$  och IL-1 $\beta$  (Taniguchi *et al.*, 2003). Hos möss med inducerad artrit och som behandlats med anti HMGB-1 antikroppar utvecklades lindrigare grad av artrit med mildare ledbrosskador och lägre uttryck av IL-1 $\beta$  än kontrollgruppen (Kokkola *et al.*, 2003).

## MATERIAL OCH METODER

Materialet som analyserades i studien samlades in från patienthästar på Mälaren Hästklirik under hösten 2013. Inklusionskriterierna var kotleder och karpalleder från hästar som artroskopierades i behandlande eller diagnostiskt syfte. Artroskopier användes då detta är guldstandard för bedömning av OA (McIlwraith *et al.*, 2012). För att få ett stort material och flera olika parameterar att jämföra inkluderades alla raser och åldrar oavsett sjukdomsduration och symtombild. Exklusionskriterier var artroskopier av andra leder än kotleder och karpalleder. Etisk ansökan för studien var godkänd (Uppsala djurförsöksetiska nämnd diarie nummer C62/13) och alla hästar som deltog i studien hade påskrivna djurägarmedgivanden. I de flesta fallen svarade djurägarna också på ett antal frågor om bland annat hästens prestationsnivå och sjukdomshistoria med tidigare behandlingar (se bilaga 1). Hästarnas ras, kön och ålder dokumenterades.

Blodprover samlades via permanentkanyl i vänster jugularven och överfördes till serumrör. Synoviaproverna togs under allmän anestesi innan leden fylldes med Ringer acetat. Synovian överfördes till ett EDTA rör och ett serumrör. Samtliga prover förvarades i kylskåp och transporterades kylt till laboratoriet för vidare omhändertagande.

Ledernas utseende och skador graderades av kirurgen enligt ett i förväg uppställt protokoll, som baserats på protokoll från McIlwraith *et al.* (McIlwraith *et al.*, 2010). Graderingsskala och förklaring till de olika graderna finns i tabell 1. Ett graderingsexempel finns i figur 3.

För att komplettera de numerära graderingarna innehöll protokollet också bilder skadorna fylls i (bilaga 2).



Figur 3. Interkarpalled med gradering 4 på både synovialmembran och erosion. Foto: Bengt Ronéus.

Tabell 1. Gradering av lefskada

	Gradering	Förklaring
Synovialmembran, synovit	0	Utan anmärkning
	1	Akut lindrig (mild hyperemi, +/- ödem, inga blödningar eller fibrin)
	2	Akut måttlig (måttlig hyperemi, +/- ödem, sparsam förekomst av fibrin och/eller blödningar)
	3	Akut kraftig (måttlig-kraftig hyperemi, omfattande förekomst av fibrin och/eller blödningar, +/- ödem)
	4	Kronisk (ingen eller mild hyperemi, hypertrofierade villi)
Ledbrosk karpus, erosion	0	Utan anmärkning
	1	Ytliga skador
	2	Erosion genom en del av brosket
	3	Erosion genom en del av brosket och genom hela brosket
	4	Utbredda erosioner genom hela brosket ner till subkondralt ben
Ledbrosk kotled, slipfårar	0	Utan anmärkning
	1	1-2 fårar som går genom en del av brosket
	2	3-5 fårar som genom en del av brosket eller 1-2 fårar genom hela brosket
	3	> 5 fårar som går genom en del av brosket eller över två som går igenom hela brosket
Ledbrosk kotled, erosion	0	Utan anmärkning
	1	Erosion genom en del av brosket under 5 mm i diameter
	2	Erosion genom en del av brosket över 5 mm i diameter
	3	Erosion genom hela brosket

För att optimera studien utförde samma kirurg alla bedömningar av de leder som är med i studien. Under flera artroskopier dokumenterades skadorna med fotografering och videoinspelning.

Sammanlagt ingick 14 hästar i studien varav 12 hästar bedömdes enligt protokollet ovan. Hästarna var fördelade på 7 varmblodiga travare, 4 svenska halvblod och 1 islandshäst varav 4 hingstar, 2 valacker och 6 ston (tabell 2). Åldersfördelningen var mellan 1 och 8 år.

Tabell 2. Rasfördelning och kön

	Sto	Valack	Hingst
Travare	2	1	4
Halvblod	3	1	
Islandshäst	1		

Efter att proverna samlats in transporterades de till laboratorium i de flesta fall inom två timmar och alla inom fyra timmar. EDTA röret med synovia lämnades till Klinisk kemiska laboratoriet på Sveriges Lantbruksuniversitet i Uppsala för leukocyträkning. Övriga prover hanterades i laboratoriet på Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF). Synovia, plasma och serum kylcentrifugerades (temperaturen 4°C) i 450 x g i 10 minuter. Därefter överfördes supernatanterna till Eppendorfrör med 250 µl i vardera rör och frystes i - 80°C.

Proverna tinades vid samma tillfälle för ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) körning med avseende på IL-1β, HMGB-1 och aktivt MMP-13 på BVF tillsammans med erfaren laboratoriepersonal. MMP-13 testet använde fluorescens för att detektera mängd aktivt MMP-13 medan de två andra testen använde absorbans. För samtliga analyser jämfördes provernas mätvärden mot standardkurvor innehållande kända koncentrationer av de analyserade proteinerna.

För IL-1β analyserna användes Equine IL-1 beta ELISA VetSet från Kingfisher Biotech Inc. (VS0131E-002) som är speciellt utvecklat för att användas på cellkulturer från häst. Tillverkarens instruktioner följdes under hela testet förutom att den första inkubationen gjordes under två timmar istället för en timme. Detta för att tillåta IL-1β att binda till antikropparna i brunnarna under längre tid samt för att resultaten då kan jämföras med tidigare analyser som utförts med den längre inkubationstiden. Nedre kvantifieringsgränsen var 3,1 ng/ml och standardkurvas intervall var 3,1-150 ng/ml.

För mätning av aktivt MMP-13 användes Fluorokine E, Human Active MMP-13 från R & D Systems (F13M00) som är framtaget för att mäta MMP-13 i humana cellkulturer. Tillverkarens instruktioner följdes under hela testet. Nedre kvantifieringsgräns var 0,25 ng/ml och standardkurvas intervall var 0,25-10 ng/ml. Känd koncentration av MMP-13 standard (3,2 ng/ml) tillsattes i ett synoviaprov för att utröna om ledvätskans egenskaper i sig utgjorde ett hinder för detektion av MMP-13.

För HMGB-1 användes HMGB1 ELISA från IBL International (Ref ST1011) som är framtaget för att mäta HMGB-1 i serum och plasma från människor. Testet är också verifierat för serum, plasma, cerebrospinalvätska, vätska från bronkoalveolärt lavage och cellkulturer från nöt, gris, kanin, mus och råtta. Testet kan även användas för att analysera prover från häst då proteinsekvensen för ekvin HMGB-1 är 99 % identisk med den humana proteinsekvensen. Tillverkarens instruktioner följdes under hela testet, standardkurvan för normal range användes. Nedre kvantifieringsgränsen var 2,5 ng/ml och standardkurvas intervall var 2,5–80 ng/ml.

För uträkning av koncentrationer och sammanställande av tabeller och diagram användes standardfunktioner i Microsoft Excel 2012 och Minitab 16. För att kontrollera korrelation mellan antal leukocyter och koncentrationen av HMGB-1 i synovia samt korrelation mellan koncentration av HMGB-1 i serum och i synovia användes Spearmans rangkorrelation. För att jämföra skillnader i HMGB-1 koncentrationer i synovia med avseende på förekomst av patologisk ledförändring användes Mann-Whitney test. Signifikansnivå för alla beräkningar var p=0,05 (95 % sannolikhet).

## RESULTAT

Sammanlagt ingick 14 hästar i studien varav 12 graderades under artroskopin utifrån den modifierade skalan. De två hästar som inte graderades räknas inte in när koncentrationer av biomarkörer korreleras till gradering av ledbröskskada och synovit. Sammanfattning av alla resultat finns i tabell 3.

Gradering av synovit gjordes i 21 leder varav 11 hade grad 4 vilket var den högsta graden av synovit. Gradering av ledbröskerosion gjordes i 11 leder varav fem var utan anmärkning (grad 0) i karpus. Gradering av ledbröskerosion i kotled gjordes i 10 leder varav sju leder var utan anmärkning (grad 0). Gradering av slipfårar i kotled gjordes i 10 leder varav fem hade grad 0. Sammanfattning av graderingarna finns i tabell 4.

Aktivt MMP-13 kvantifierades inte i något prov från patienthästarna vare sig i serum eller i synovia. I det synoviaprover där känd koncentration MMP-13 tillsatts uppmättes 0,8 ng/ml totalt MMP-13.

IL-1 $\beta$  kvantifierades i både synovia och serum från en häst (tabell 3).

Leukocytantalet i synovian varierade mellan 90 leukocyter/ $\mu$ l och 1710 leukocyter/ $\mu$ l, medelvärde var 431 leukocyter/ $\mu$ l och medianvärdet var 265 leukocyter/ $\mu$ l. Åtta synoviaprover hade över 500 leukocyter/ $\mu$ l och 2 av dessa prover hade över 1000 leukocyter/ $\mu$ l. Mellan leukocytantal och koncentration av HMGB-1 i synovia fanns en stark korrelation som var statistiskt signifikant, Spearman;  $\rho=0,87$ ,  $p=4 \times 10^{-8}$  (figur 9).

HMGB-1 kvantifierades i 21 av 24 synoviaprover och i 12 av 14 serumprover. I nästan samtliga synoviaproverna från kotleder var HMGB-1 kvantifierbart. I samtliga radiokarpalledsprover och i fyra av de sju proverna från interkarpalleden var HMGB-1 kvantifierbart (tabell 3 och 5). De högsta värdena kvantifierades i karpalleder och i kotleder med fraktur (d.v.s. osteokondralt fragment som uppkommit akut och orsakat kliniska symtom). Sammanfattning av HMGB-1 värdena finns i tabell 3 och 5 samt figur 4-8. Det fanns ingen statistisk skillnad mellan HMGB-1 koncentrationer i synovia från led med eller utan synovit (Mann-Whitney,  $p=0,37$ ). Mellan koncentrationer av HMGB-1 i synovia från led med eller utan fraktur fanns ingen statistisk skillnad (Mann-Whitney,  $p=0,06$ ) (figur 10). Ingen statistisk korrelation kunde påvisas mellan koncentrationer av HMGB-1 i synovia och serum oavsett om uträkningarna gjordes på medelvärden av koncentrationer i synovia (Spearman;  $\rho=0,086$ ,  $p=0,77$ ), den högsta synoviakoncentrationen (Spearman;  $\rho=0,35$ ,  $p=0,23$ ) eller den lägsta synoviakoncentrationen (Spearman;  $\rho=0,24$ ,  $p=0,41$ ). Dock hittades fler höga koncentrationer av HMGB-1 i synovia än i serum. Materialet var för litet för att kunna undersöka om det fanns en korrelation mellan grad av ledskada och koncentration av HMGB-1.

Tabell 3. Sammanställning av mätvärden

Häst, ben, led				Ledvätska			Serum			Graderingar			
	Ålder (år)	Kön	Ras	Leukocytantal (10x6/L)	IL-1β (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)	IL-1 β (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)	Synovit	Karpus erosion	Kotled erosion	Kotled slipfårar	Osteokondrala fragment Akuta      Kroniska
1 VB MTP	1	H	VT	760	<3.1	31,5	<3.1	4,2	1		0	3	Styrlistfraktur
2 HF MCP	2	S	SvHb	280	<3.1	7,5	<3.1	11,6	1		0	0	POF
2 HB MTP				220	<3.1	<2,5			1		0	0	DOF
3 VF IC	5	S	SvHb	1160	<3.1	46,8	<3.1	11,2	4	0			
3 VF RC				1710	<3.1	35,4			4	0			
4 VF MCP	6	V	VT	240	<3.1	45,7	<3.1	<2,5	2		3	0	SBF
5 VF MCP	4	S	VT	200	<3.1	5,3	<3.1	4,7	4		0	3	
5 VF IC				180	<3.1	<2,5			4	3			
6 HB MTP	3	H	VT	590	<3.1	33,2	<3.1	6,3	1		3	0	SBF
7 VF IC	4	H	VT	740	<3.1	28,4	<3.1	37,6	4	4			
7 HF IC				190	<3.1	5,5			4	4			
8 HF IC	5	S	SvHb	540	<3.1	21,7	<3.1	14,6	4	2			
8 HF RC				750	<3.1	50,0			4	2			
9 HF IC	6	V	SvHb	90a	<3.1	<2,5	<3.1	8,1	4	1			
9 HF RC				300a	<3.1	11,0			0	0			
9 VF IC				100a	<3.1	<2,5			0	0			
9 VF RC				140a	<3.1	6,4			4	0			
10 HF MCP	6	S	Isl	160	<3.1	4,0	<3.1	11,3	-		-	-	
10 VF MCP				490	<3.1	16,6			-		-	-	
11 VB MTP	8	H	VT	170	13,9	6,8	20,6	3,2	-		-	-	
12 HB MTP	1	S	VT	290	<3.1	9,0	<3.1	3,9	0		0	1	POF
13 HF MCP	6	S	SvHb	240	<3.1	6,6	<3.1	<2,5	4		3	2	
14 VB MTP	2	V	VT	560	<3.1	21,7	<3.1	9,3	1		0	2	POF
14 HB MTP				250	<3.1	23,0			1		0	0	

a, Analyserat två dagar efter provtagning. -, Ej graderad. VB, vänster bak. VF, vänster fram. HB, höger bak. HF, höger fram. IC, intercarpal, RC, radiocarpal, MCP, metacarpophalangeal. MTP, metatarsophalangeal. IL-1β, interleukin 1β. HMGB-1, high mobility group box protein 1. POF, plantart/palmart osteochondralt fragment. DOF, dorsalt osteochondralt fragment. SBF, sesamoidbensfraktur.



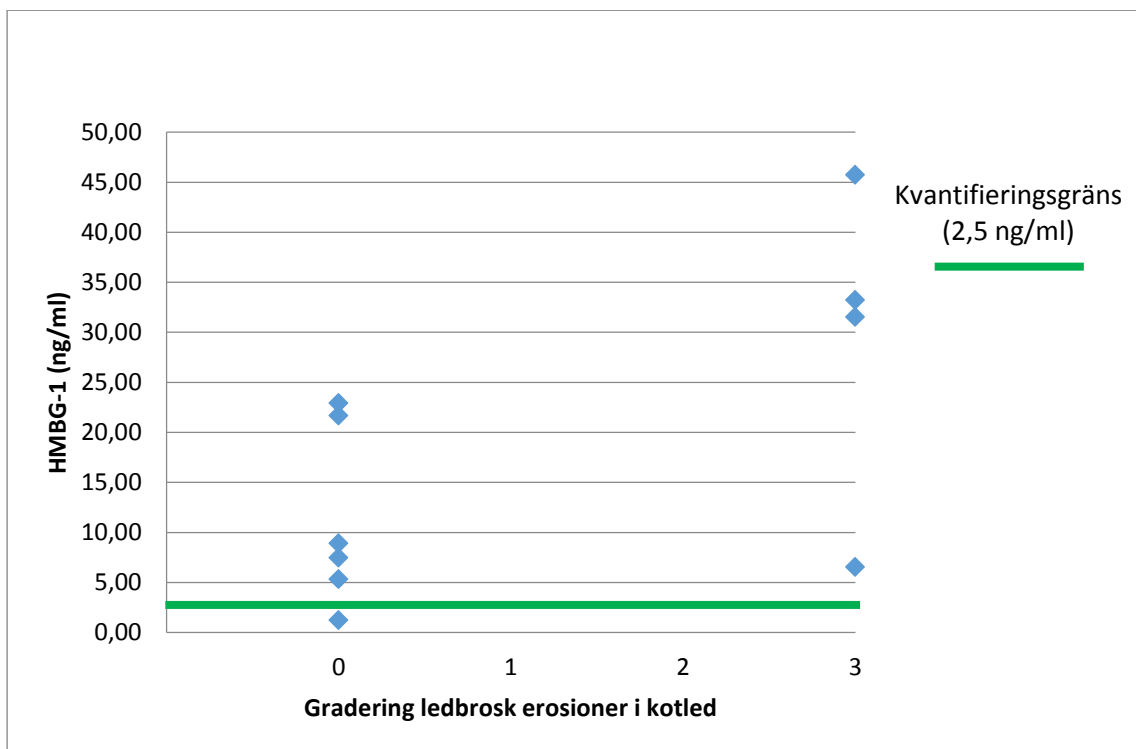
Tabell 4. *Sammanfattning av makroskopiska ledförändringar detekterade vid artroskopi*

	Gradering	Antal leder
Synovialmembran, synovit	0	3
	1	6
	2	1
	3	0
	4	11
Totalt antal leder:		21
Ledbrosk karpus, erosion	0	5
	1	1
	2	2
	3	1
	4	2
Totalt antal leder:		11
Ledbrosk kotled, slipfårar	0	5
	1	1
	2	2
	3	2
Totalt antal leder:		10
Ledbrosk kotled, erosion	0	7
	1	0
	2	0
	3	3
Totalt antal leder:		10

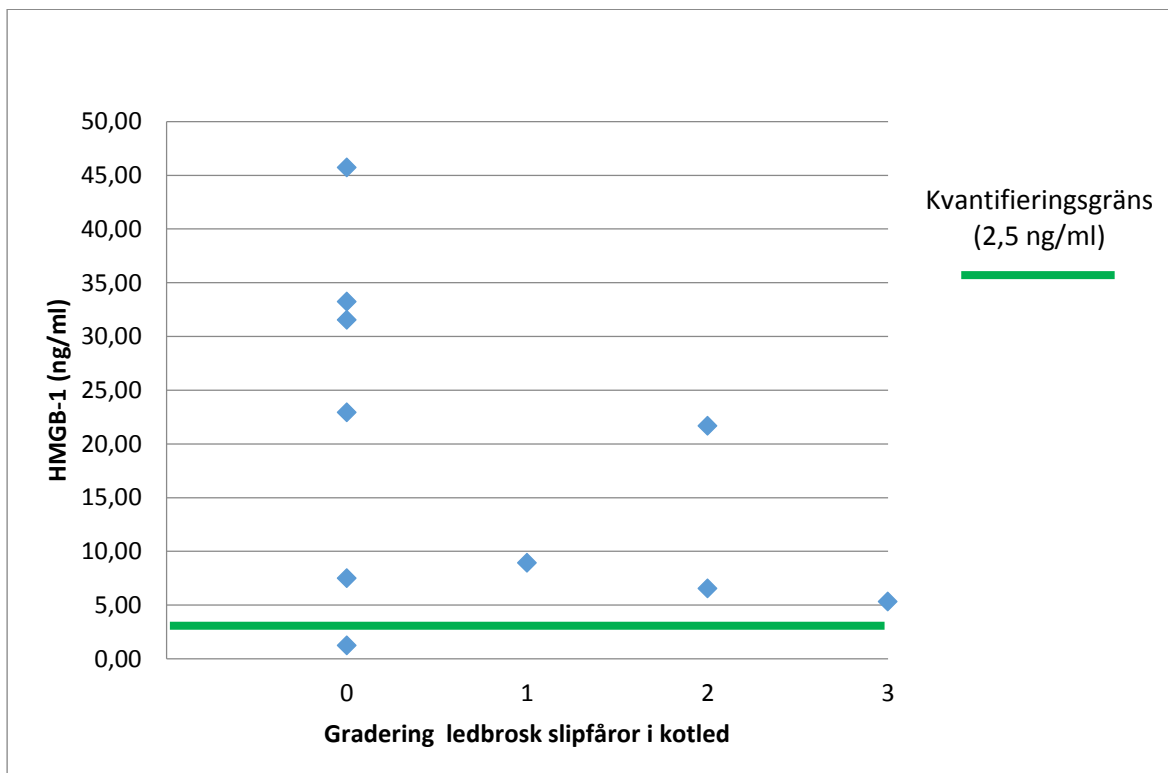
Tabell 5. *Koncentration HMGB-1 i synovia från olika leder*

	Antal undersökta prover	Antal prover med detekterat HMGB-1	Koncentration HMGB-1 (ng/ml)	
			Medelvärde (intervall)	Medianvärde
Kotled	13	12	17,6 (4,0-45,7)	12,8
Interkarpal	7	4	25,6 (5,5-46,8)	5,5
Radiokarpal	4	4	25,7 (6,4-50,0)	23,2

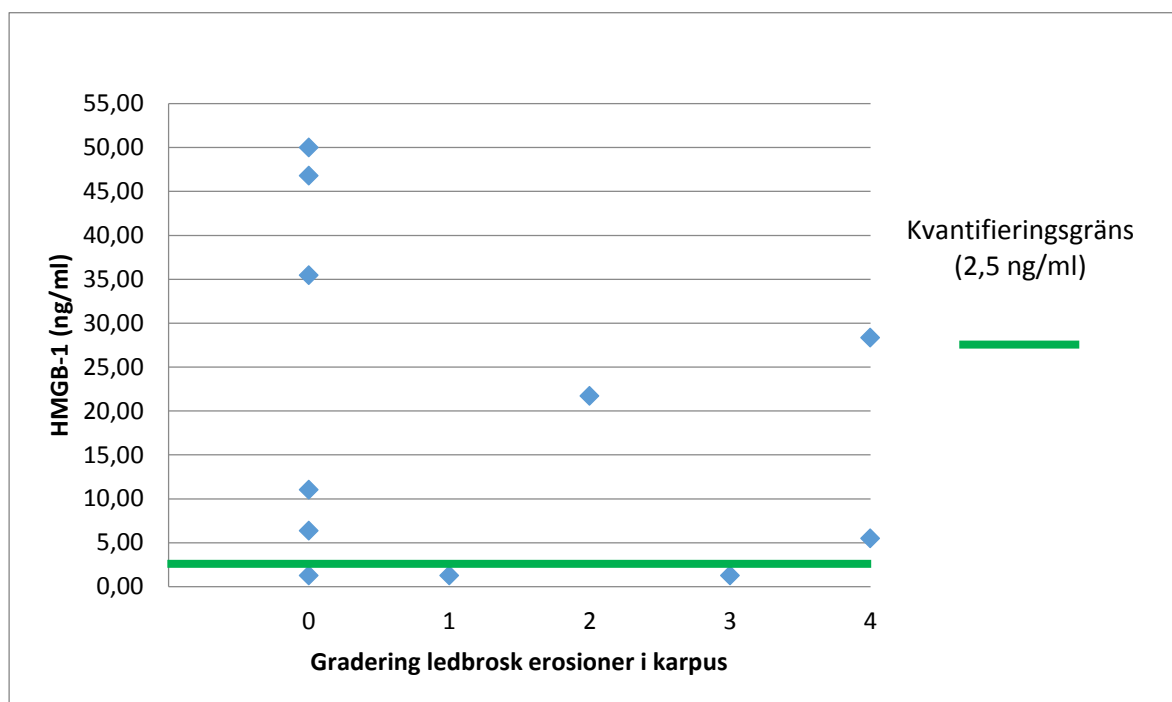
Medianvärden beräknat på samtliga undersökta prover. För medelvärden har endast värden över detektionsgräns inkluderats i uträkningarna.



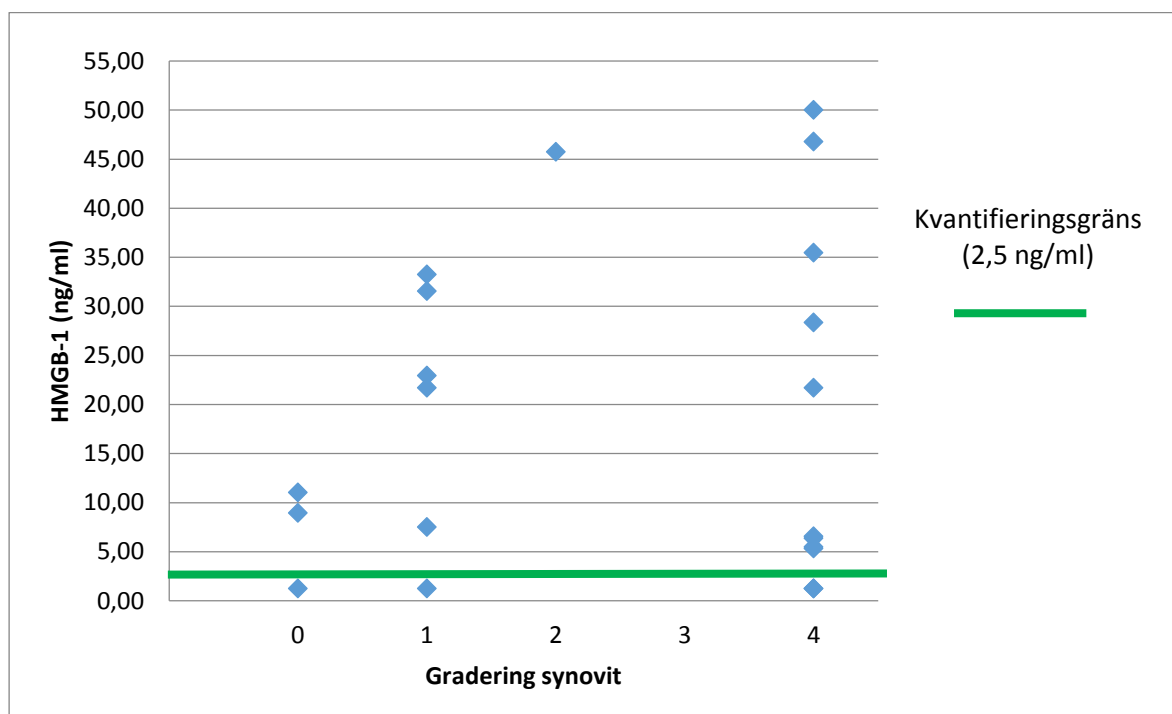
Figur 4. Koncentration av HMGB-1 i synovia vid olika grader av ledbrosk erosion i kotled.  
 Prov under kvantifieringsgränsen 2,5 ng/ml redovisas som 1,25 ng/ml.



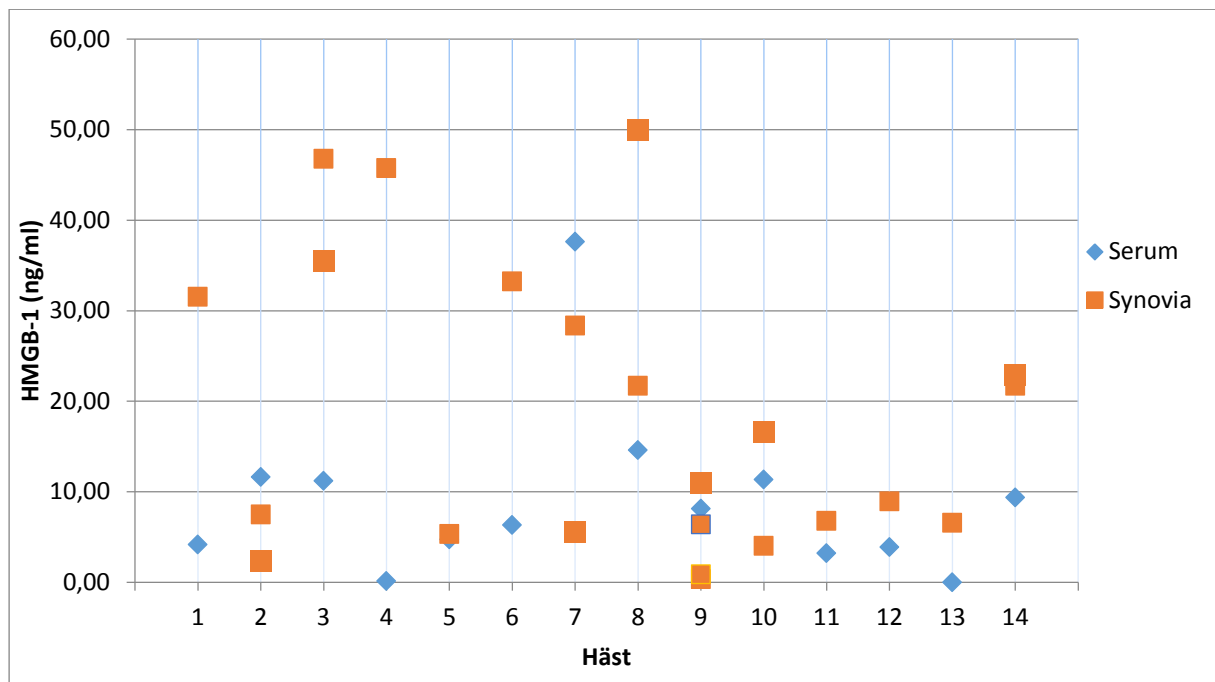
Figur 5. Koncentration av HMGB-1 i synovia vid olika grader av ledbrosk slippfårar i kotled.  
 Prov under kvantifieringsgränsen 2,5 ng/ml redovisas som 1,25 ng/ml.



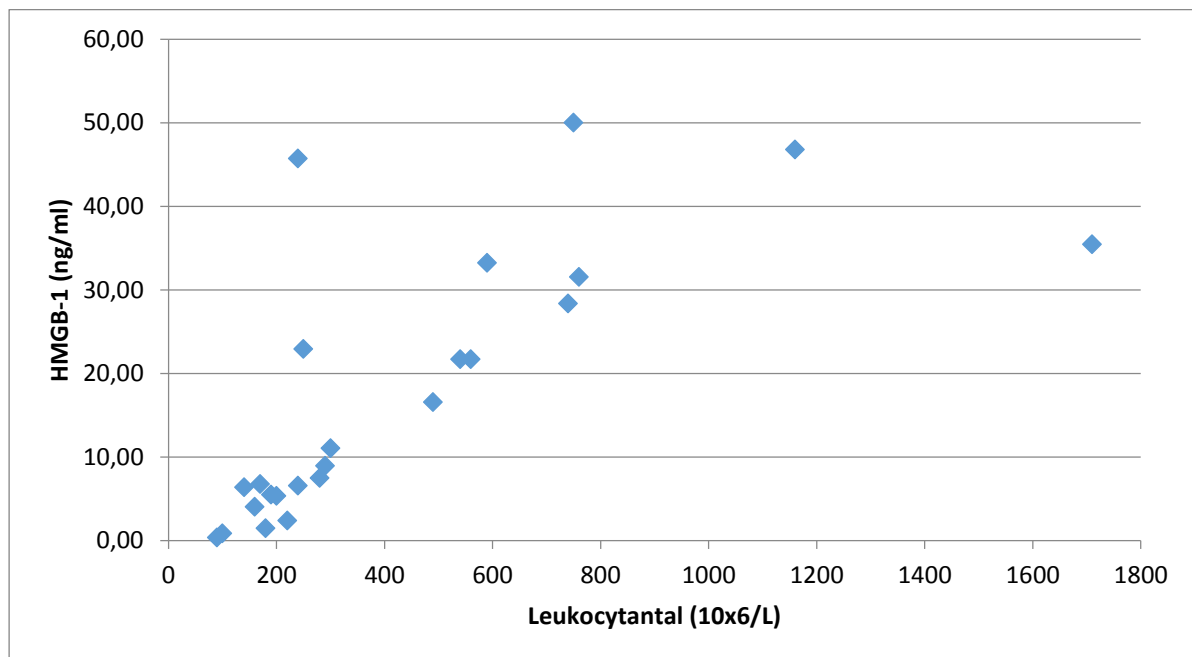
Figur 6. Koncentration av HMGB-1 i synovia vid olika grader av ledbrosk erosioner i karpus.  
 Prov under kvantifieringsgränsen 2,5 ng/ml redovisas som 1,25 ng/ml.



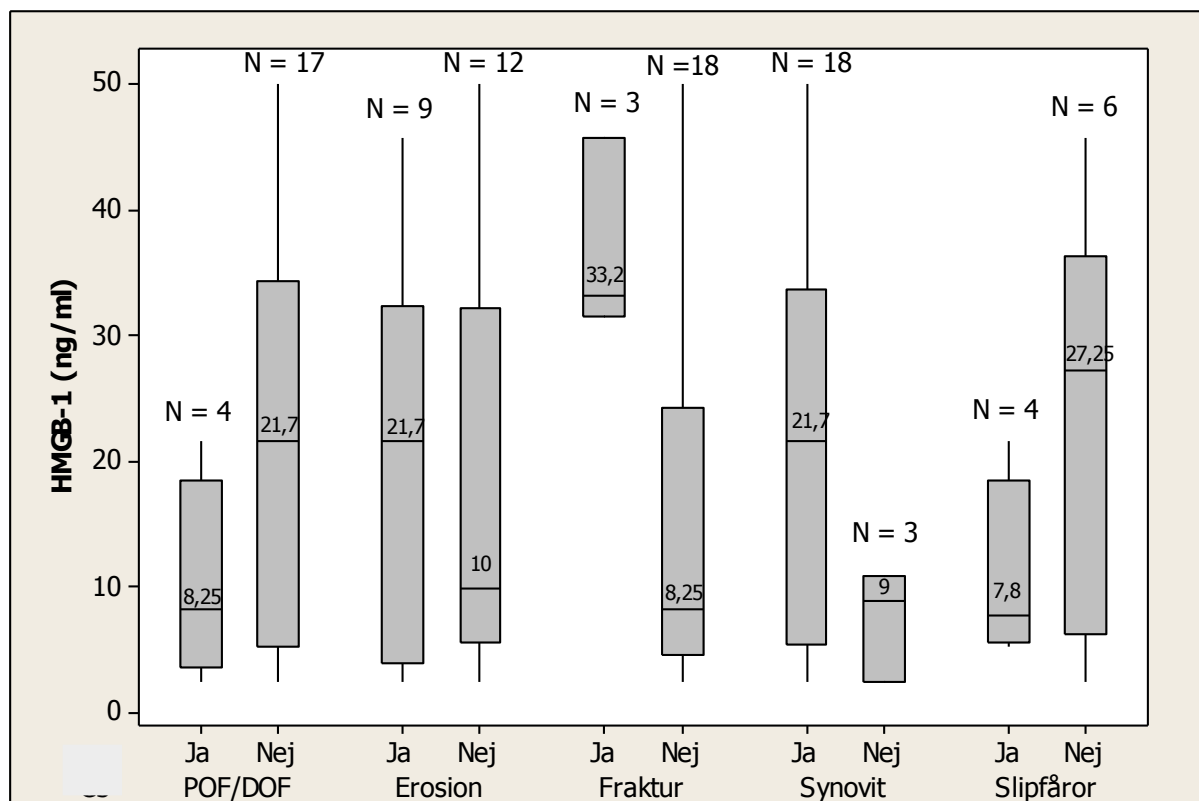
Figur 7. Koncentration av HMGB-1 i synovia vid olika grader av synovit i kotleder och karpalleder.  
 Prov under kvantifieringsgränsen 2,5 ng/ml redovisas som 1,25 ng/ml.



Figur 8. Koncentrationer av HMGB-1 i serum och synovia hos olika individer.



Figur 9. Koncentration av HMGB-1 och leukocytantal i synovia. Spearman;  $\rho = 0,87$ ,  $p = 4 \times 10^{-8}$



Figur 10. Koncentration av HMGB-1 i synovia vid förekomst eller inte av olika ledpatologier. I figuren representerar strecket i lådan medianen, den undre lådkanten nedre kvartilen och den övre lådkanten övre kvartilen. POF=palmart/plantart osteokondralt fragment, DOF=dorsalt osteokondralt fragment, N= antal leder, Fraktur; styrlistfraktur och sesamiodbensfraktur.

## DISKUSSION

Makroskopisk bedömning av leddskadorna utfördes av en erfaren ortopedisk kirurg som både är VMD (veterinärmedicinsk doktor) och diplomat i ECVS (European College of Veterinary Surgeons) och har många års erfarenhet av artroskopi. Detta ökar säkerheten i bedömningarna av skadorna, vilka kommer att kunna jämföras med bedömningar i andra studier som använder samma graderingsskala. Tidigare studier har bekräftat att makroskopisk bedömning av ledbrusk korrelerar väl med det histologiska utseendet (Neundorf *et al.*, 2010) vilket gör att den makroskopiska bedömningen kan betraktas som en sann bedömning på ledens status.

IL-1 $\beta$  detekterade endast i prover från en häst. En studie har visat att IL-1 $\beta$  koncentrationer över 4,5 pg/ml (0,0045 ng/ml) i synovia är en bra indikation på leddskada (Bertone *et al.*, 2001). Dock använde författarna en ELISA framtagen för humant bruk vilket gör resultaten från den studien osäkra. Eftersom metoden i detta arbete uppmätte koncentrationer i nanogramsnivå och inte picogramsnivå är det möjligt att metoden ej detekterat mycket låga IL-1 $\beta$  koncentrationer. Den häst med kvantifierbart IL-1 $\beta$  var en äldre häst som tränat och tävlat hårt. Hästen har haft upprepade problem med hältor och senskador och behandlats flertalet gånger med olika preparat. Vid provtagningstillfället hade den en aktiv senskada och var halt på frambenen. Artroskopin gjordes av en annan kirurg varför leden inte blev graderad. Då det är en högre koncentration i blodet än i den provtagna leden går det inte att säga att det är den provtagna leden som är orsaken till den höga nivån i blodet utan det kan vara en process som pågår någon annanstans i kroppen. En forskargrupp har visat att det är skillnad i koncentration av biomarkörer mellan leder med aktiv OA och motstående led hos samma individ, där leden med aktiv OA uppvisar de högre koncentrationerna (Fuller *et al.*, 2001). Den förhöjda koncentration av IL-1 $\beta$  som uppmättes i ledvätska från hästen i denna studie kan vara till följd av sjukliga processer i den provtagna leden.

HMGB-1 detekterades i de flesta prover (20/24) med de högsta koncentrationerna i prover från karpalleder och kotleder med fraktur. I 18 av 21 leder påvisades synovit (figur 10). Ingen statistisk skillnad kunde bekräftas mellan koncentrationer av HMGB-1 och närvaro av synovit. Dock vore det intressant att utföra samma beräkningar med ett större material. Detta då leder med synovit ofta hade en högre koncentration av HMGB-1 än de leder utan synovit. Mellan leder med och utan fraktur var skillnaden i koncentrationer av HMGB-1 nära signifikant ( $p=0,06$ ) trots att antalet hästar i den ena gruppen bara är tre. Däremot syns inga sådana tendenser vad gäller förekomst eller inte av erosioner, slipfårar eller osteokondrala fragment (POF/DOF) (figur 4-6,10). Brown *et al.* har i en studie visat att HMGB-1 värden i synovia från kotleder över 11 ng/ml innebar en 2 gånger ökad sannolikhet att leden drabbats av en osteokondral skada. I karpalleder innebar ett värde över 9 ng/ml en 4 gånger ökad sannolikhet att leden drabbats av en osteokondral skada (Brown *et al.*, 2009). Författarna använde bara hästar med fragment som gett kliniska symtom vilket gör att de uppmätta koncentrationerna inte är jämförbara med koncentrationerna i den här studien. Dock hade de tre hästarna i den här studien med frakturer (och kliniska symtom) HMGB-1 värden mellan 31,5 och 45,7 ng/ml vilket är ungefär tre gånger högre än medianvärdet för gruppen kotled. Detta stämmer överens med resultaten i studien av Brown *et al.*. Hästarna med POF eller DOF i den här studien hade inga kliniska symtom vilket kan förklara skillnaden gentemot

frakturerna och mot Browns studie. Skillnaden kan också bero på att POF/DOF och osteochondrala fragment med kliniska symtom har olika patogenes, POF/DOF förklaras ofta som en utvecklingsrubbing (osteochondrosis dissecans) medan fragment som uppstår i samband med hård träning/tävling förklaras med överbelastning och utslitning. I den här studien hade alla POF/DOF upptäckts vid normal kontrollröntgen emedan frakturerna upptäckts då de hästarna visade kliniska symtom. Ingen korrelation mellan HMGB-1 i synovia och serum kan påvisas förutom att koncentrationerna tenderar att vara något högre i synovia (figur 8). Om det varit ett större material är det möjligt att det gått att fastställa ett cut off värde för fraktur och grad av synovit på samma vis som Brown *et al.* fastställde värden för osteokondrala fragment i kotled och karpalled. Materialet var för litet för att få tillräckligt antal hästar med olika gradering av de olika lesionerna för att kunna analysera om det fanns någon skillnad i HMGB-1 koncentration mellan de olika grupperna.

Resultaten med kända koncentrationer av MMP-13 standard visade att MMP-13 testet fungerade. Aktivt MMP-13 detekterades inte i något prov från patienthäst vare sig i synovia eller i serum. I synoviaprovet med tillsatts av känd mängd MMP-13 uppmättes lägre än förväntade koncentrationer, vilket kan tala för att metoden inte är lämplig för synovianalys. Metoden är inte heller validerad för synovia och serum utan bara för cellkulturer. Ytterligare metodutveckling och validering behövs för att undersöka om metoden är lämplig att användas på serum och synovia.

Antalet leukocyter i synoviaproverna var låga, endast 8 av 24 prover var över normalgränsen och av dessa var det bara två som låg mycket över gränsen. Det stämmer överens med litteraturen för vad som är normalt vid OA (Steel, 2008). Normalantalet leukocyter i synovia är under 500 leukocyter/ $\mu$ l (de Grauw, 2011) och vanligen runt 200 leukocyter/ $\mu$ l (Mahaffey, 2002; Davies, 1945). De två proverna med högst leukocytantal kom från samma häst som dagen innan operation hade bedövats i lederna med mepivakainhydroklorid (Carbocain 20 mg/ml) vilket påverkar leukocytantalet (White *et al.*, 1989). En stark signifikant korrelation mellan leukocytantal och HMGB-1 koncentration kan ses i synoviaproverna, vilket inte är helt överraskande med tanke på att båda bidrar till och är aktiva i inflammation (figur 9). Att det fanns en korrelation mellan koncentration av HMGB-1 och antal leukocyter i synovia trots att leukocyterna var under gränsen för vad som anses normalt är ett intressant fynd som borde undersökas vidare.

Brister med studien var ett för litet och för heterogent material vilket bidragit till att bara ett signifikant resultat kan presenteras. Ett större material som kan delas in i mer homogena grupper än i den här studien vore optimalt. Vid vissa av artroskopierna undersöktes inte hela leden vilket innebär att det kan ha funnits patologiska förändringar som påverkade de potentiella biomarkörerna men som inte upptäcktes under operation. Det gällde framförallt POF/DOF artroskopierna men inga av dessa värden påverkade resultaten på något avgörande sätt då värdena från de hästarna ligger i närheten av medelvärde och medianvärde för kotled. Fyra av synoviaproverna analyserades inte på en gång med avseende på leukocytantal på grund av icke fungerande laboratorieutrustning, vilket gör att det inte går att utesluta att tidsfördröjningen gett ett förändrat resultat. Värdena låg i underkant jämfört med övriga leukocytvärden och det är möjligt att de skulle ha varit högre om de analyserats på en gång.

Leukocyter bör inte förvaras längre än 24 timmar då cellerna är känsliga och riskerar att gå sönder i räkningsprocessen, vilket kan ge ett falskt lågt värde.

Sammanfattningsvis behövs en större studie för att kunna avgöra om det finns en statistisk skillnad mellan olika grader av synovit och koncentration av HMGB-1 i ledvätska. Samt för att kunna fastslå att det finns en statistisk skillnad mellan förekomst av fraktur eller inte och koncentration av HMGB-1 i synovia. I det här begränsade materialet fanns inget som tydde på att POF/DOF, erosion eller slipfårar är associerat med förhöjda koncentrationer av HMGB-1. För att vidare undersöka om IL-1 $\beta$  koncentrationer i synovia kan hjälpa till vid diagnostik av OA behöver ett känsligare test utvärderas. Även för MMP-13 analyser behöver testmetoden bli känsligare och kanske är det bättre att mäta den totala mängden MMP-13 istället för endast den aktiva delen. Detta då den totala mängden MMP-13 är högre än endast den aktiva mängden vilket kan göra det lättare att kvantifiera.

Hypotesen att desto gravare patologisk ledförändring desto högre koncentrationer av IL-1 $\beta$  och aktivt MMP-13 har inte bekräftats i den här studien och även med avseende på HMGB-1 behövs ytterligare studier. Dock finns det en tendens till ett samband mellan höga koncentrationer av HMGB-1 och intraartikulär fraktur, samt en statistisk korrelation mellan koncentrationer av HMGB-1 i ledvätska och leukocytantalet. Hypotesen att nivåerna av markörer i synovia och serum skulle vara korrelerade har inte bevisats.



## KONKLUSION

Studien har inte kunnat visa att koncentrationer av IL-1 $\beta$  eller aktivt MMP-13 i ledvätska eller serum kan användas för att diagnostisera patologiska ledförändringar i kot- och karpalleder hos häst. Däremot att det är möjligt att HMGB-1 kan användas som indikator för ledsador med framför allt ett inflammatoriskt inslag. Fortsatta studier behövs för att vidare undersöka potentialen för HMGB-1 som biomarkör för OA.

## **TACK**

Tack till Bengt Ronéus som lät mig vara med under operationerna och graderade alla leder. Tack även till all den övriga personalen på Mälaren Hästklinik för all hjälp. Tack till Maria Löfgren för undervisningen i laboratoriet och till Jon Samuelsson för hjälpen i labbet och de excellenta tidsplanerna. Tack till Stina Ekman för idéer och kommentarer. Tack till Carina Ingvast-Larsson för tålamodet. Framförallt tack till Cecila Ley för det stora tålamodet och engagemanget.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Atkinson, A.J., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G., DeMets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C., Schooley, R.T., Spilker, B.A., Woodcock, J. & Zeger, S.L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3), 89-95.
- Bertone, A. (2004a). Distal limb: fetlock and pastern. *HINCHCLIFF, K.; KANEPS, A.; GEOR, RJ Equine sports medicine and surgery: basic and clinical sciences of equine athlete. St Louis, Mo: Saunders.*
- Bertone, A.L. (2004b). Joint physiology: responses to exercise and training. In: Hinchcliff K.W., K.A.J.G.R.J. (Ed.) *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete*. pp. 152-160. China: Saunders.
- Bertone, A.L., Palmer, J.L. & Jones, J. (2001). Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. In: *Vet Surg*. pp. 528-38. United States: 2001 by The American College of Veterinary Surgeons; 30). ISBN 0161-3499 (Print) 0161-3499 (Linking).
- Bougault, C., Gosset, M., Houard, X., Salvat, C., Godmann, L., Pap, T., Jacques, C. & Berenbaum, F. Stress-induced matrix metalloproteinase production in cartilage does not depend on NALP3-inflammasome in osteoarthritis. In: *Proceedings of European Calcified Tissue Society Conference ECTS 2012*, Lisbon, Portugal, 2013 2013. p. 257. ISBN DOI:10.1530/boneabs.1.PP257.
- Brama, P.A., Karssenbergh, D., Barneveld, A. & van Weeren, P.R. (2001). Contact areas and pressure distribution on the proximal articular surface of the proximal phalanx under sagittal plane loading. *Equine Vet J* 33(1), 26-32.
- Brama, P.A., TeKoppele, J.M., Beekman, B., van Weeren, P.R. & Barneveld, A. (1998). Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. *Ann Rheum Dis* 57(11), 697-9.
- Bramlage, L.R. (1983). Surgical diseases of the carpus. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 5(2), 261-74.
- Brown, M.P., Trumble, T.N. & Merritt, K.A. (2009). High-mobility group box chromosomal protein 1 as a potential inflammatory biomarker of joint injury in Thoroughbreds. *Am J Vet Res* 70(10), 1230-5.
- Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. & Grodzinsky, A.J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54, 465-80.
- Burrage, P.S., Mix, K.S. & Brinckerhoff, C.E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 11, 529-43.
- Busschers, E., Holt, J.P. & Richardson, D.W. (2010). Effects of glucocorticoids and interleukin-1 beta on expression and activity of aggrecanases in equine chondrocytes. *Am J Vet Res* 71(2), 176-85.
- Caron, J.P. (2005). Intra-articular injections for joint disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 21(3), 559-73, v.
- Caron, J.P. (2011). Chapter 61 - Osteoarthritis. In: Ross, M.W., et al. (Eds.) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse (Second Edition)*. pp. 655-668. Saint Louis: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4160-6069-7.
- Chiaradia, E., Pepe, M., Tartaglia, M., Scoppetta, F., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Avellini, L., Moriconi, F., Gaiti, A., Bertuglia, A., Beccati, F. & Scaloni, A. (2012). Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. *J Proteomics* 75(14), 4478-93.
- Copelan, R. & Bramlage, L. (1983). Surgery of the fetlock joint [of the horse]. *The veterinary clinics of North America* 5.

- Cruz, A.M. & Hurtig, M.B. (2008). Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? *Vet Clin North Am Equine Pract* 24(1), 101-16.
- Davies, D.V. (1945). The cell content of synovial fluid. *J Anat* 79(Pt 2), 66-73.
- de Grauw, J.C. (2011). Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Vet Q* 31(2), 77-86.
- de Grauw, J.C., Donabedian, M., van de Lest, C.H., Perona, G., Robert, C., Lepage, O., Martin-Rosset, W. & van Weeren, P.R. (2011). Assessment of synovial fluid biomarkers in healthy foals and in foals with tarsocrural osteochondrosis. *Vet J* 190(3), 390-5.
- Dinareello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-50.
- Dyson, S.J. (2013). Clinical aspects of subchondral bone pain in the fetlock in racehorses and sportshorses. In: *Proceedings of The British Equine Veterinary Association Congress, Manchester 2013*. p. 36. Cambs: Equine Veterinary Journal.
- Egenvall, A., Penell, J.C., Bonnett, B.N., Olson, P. & Pringle, J. (2005). Morbidity of Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000: variations with age, sex, breed and location. *Vet Rec* 157(15), 436-43.
- Egenvall, A., Penell, J.C., Bonnett, B.N., Olson, P. & Pringle, J. (2006). Mortality of Swedish horses with complete life insurance between 1997 and 2000: variations with sex, age, breed and diagnosis. *Vet Rec* 158(12), 397-406.
- Ekman, S. (2010). Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst–bakgrundsdocumentation. *Information från Läke-medelsverket*, 14.
- Frisbie (2012). Synovial Joint Biology and Pathobiology. In: Auer, *et al.* (Eds.) *Equine Surgery*. Fourth. ed. pp. 1096-1114. United States: Elsevier.
- Frisbie, D.D. (2005). Future directions in treatment of joint disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 21(3), 713-24, viii.
- Fuller, C.J., Barr, A.R., Sharif, M. & Dieppe, P.A. (2001). Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* 9(1), 49-55.
- Goldring, M.B. & Goldring, S.R. (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213(3), 626-34.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. & Thorgeirsson, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(2), 111-22.
- Goodrich, L.R. & Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* 171(1), 51-69.
- Gough, M.R., Mayhew, I.G. & Munroe, G.A. (2002). Diffusion of mepivacaine between adjacent synovial structures in the horse. Part 1: forelimb foot and carpus. *Equine Vet J* 34(1), 80-84.
- Heinola, T., Kouri, V.P., Clarijs, P., Ciferska, H., Sukura, A., Salo, J. & Konttinen, Y.T. (2010). High mobility group box-1 (HMGB-1) in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol* 28(4), 511-8.
- Helminen, H.J., Hyttinen, M.M., Lammi, M.J., Arokoski, J.P., Lapveteläinen, T., Jurvelin, J., Kiviranta, I. & Tammi, M.I. (2000). Regular joint loading in youth assists in the establishment and strengthening of the collagen network of articular cartilage and contributes to the prevention of osteoarthrosis later in life: a hypothesis. *J Bone Miner Metab* 18(5), 245-57.
- Kamm, J.L., Nixon, A.J. & Witte, T.H. (2010). Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. *Equine Vet J* 42(8), 693-9.
- Knauper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S.J., Stanton, H., Hembry, R.M. & Murphy, G. (1996). Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13)

- activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271(29), 17124-31.
- Kokkola, R., Andersson, A., Mullins, G., Ostberg, T., Treutiger, C.J., Arnold, B., Nawroth, P., Andersson, U., Harris, R.A. & Harris, H.E. (2005). RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol* 61(1), 1-9.
- Kokkola, R., Li, J., Sundberg, E., Aveberger, A.C., Palmblad, K., Yang, H., Tracey, K.J., Andersson, U. & Harris, H.E. (2003). Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 48(7), 2052-8.
- Kokkola, R., Sundberg, E., Ulfgren, A.K., Palmblad, K., Li, J., Wang, H., Ulloa, L., Yang, H., Yan, X.J., Furie, R., Chiorazzi, N., Tracey, K.J., Andersson, U. & Harris, H.E. (2002). High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 46(10), 2598-603.
- Kumar, P., Oka, M., Toguchida, J., Kobayashi, M., Uchida, E., Nakamura, T. & Tanaka, K. (2001). Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. *J Anat* 199(Pt 3), 241-50.
- Lacourt, M., Gao, C., Li, A., Girard, C., Beauchamp, G., Henderson, J.E. & Lavery, S. (2012). Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 20(6), 572-83.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R. & Goldring, M.B. (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64(6), 1697-707.
- Mahaffey, E.A. (2002). Synovial Fluid. In: Cowell, R.L., et al. (Eds.) *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2:nd. ed. pp. 163-170 Elsevier Health Sciences. ISBN 0323013171.
- Martel-Pelletier, J., Alaaeddine, N. & Pelletier, J.P. (1999). Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 4, D694-703.
- Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J.P. (1996). Wanted--the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage! *Br J Rheumatol* 35(9), 818-20.
- Martel-Pelletier, J., Mccollum, R., Dibattista, J., Faure, M.P., Chin, J.A., Fournier, S., Sarfati, M. & Pelletier, J.P. (1992). The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis & Rheumatism* 35(5), 530-540.
- McIlwraith, C.W. Disease processes of synovial membrane, fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. In: *Proceedings of Proceedings of 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* 2001. pp. 142-156.
- McIlwraith, C.W. (2005). Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet J* 37(5), 473-82.
- McIlwraith, C.W. (2011). Joint Injuries and Disease and Osteoarthritis. In: Baxter, G.M. (Ed.) *Adams and Stashak's Lameness in the Horses*. 6e. ed. pp. 871-889. Oxford: Blackwell
- McIlwraith, C.W., Billingham, R.C. & Frisbie, D.D. Current and future diagnostic means to better characterize osteoarthritis in the horse—routine synovial fluid analysis and synovial fluid and serum markers. In: *Proceedings of AAEP Proceedings* 2001. pp. 171-179.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D. & Kawcak, C.E. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* 1(11), 297-309.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Fuller, C.J., Hurtig, M. & Cruz, A. (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S93-105.
- McIlwraith, C.W. & Trotter, G.W. (2001). Joint disease in the horse. *EQUINE IMMUNOLOGY IN 2001*, 94.

- Mobasheri, A. (2012). Osteoarthritis year 2012 in review: biomarkers. *Osteoarthritis Cartilage* 20(12), 1451-64.
- Neundorff, R.H., Lowerison, M.B., Cruz, A.M., Thomason, J.J., McEwen, B.J. & Hurtig, M.B. (2010). Determination of the prevalence and severity of metacarpophalangeal joint osteoarthritis in Thoroughbred racehorses via quantitative macroscopic evaluation. *Am J Vet Res* 71(11), 1284-93.
- Park, J.S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J.Y., Strassheim, D., Sohn, J.W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., Ishizaka, A. & Abraham, E. (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(3), C917-24.
- Penell, J.C., Egenvall, A., Bonnett, B.N., Olson, P. & Pringle, J. (2005). Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *Vet Rec* 157(16), 470-7.
- Pisetsky, D.S., Erlandsson-Harris, H. & Andersson, U. (2008). High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 10(3), 209.
- Pullerits, R., Jonsson, I.M., Verdrengh, M., Bokarewa, M., Andersson, U., Erlandsson-Harris, H. & Tarkowski, A. (2003). High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum* 48(6), 1693-700.
- Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M. & Martel-Pelletier, J. (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 97(9), 2011-9.
- Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentinis, B., Catalanotti, F., Giazson, M., Dumitriu, I.E., Muller, S., Iannaccone, M., Traversari, C., Bianchi, M.E. & Manfredi, A.A. (2004). HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 5(8), 825-30.
- Ruggles, A.J. (2012). Chapter 94 - Carpus. In: Auer, J.A., et al. (Eds.) *Equine Surgery (Fourth Edition)*. pp. 1347-1363. Saint Louis: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4377-0867-7.
- Sadouk, M.B., Pelletier, J.P., Tardif, G., Kiansa, K., Cloutier, J.M. & Martel-Pelletier, J. (1995). Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Lab Invest* 73(3), 347-55.
- Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418(6894), 191-5.
- Schroder, K. & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140(6), 821-32.
- Sha, Y., Zmijewski, J., Xu, Z. & Abraham, E. (2008). HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J Immunol* 180(4), 2531-7.
- Shlopov, B.V., Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S. & Hasty, K.A. (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 40(11), 2065-74.
- Smith, S.B. & Clegg, P. (2007a). Treatment of equine joint diseases Part 1: Pharmacological management of equine osteoarthritis (OA). *Companion Animal* 12(4), 9-15.
- Smith, S.B. & Clegg, P. (2007b). Treatment of equine joint diseases Part 2: Surgical and physical treatment of equine osteoarthritis. *Companion Animal* 12(8), 10-15.
- Stahle-Backdahl, M., Sandstedt, B., Bruce, K., Lindahl, A., Jimenez, M.G., Vega, J.A. & Lopez-Otin, C. (1997). Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 76(5), 717-28.
- Steel, C.M. (2008). Equine synovial fluid analysis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24(2), 437-54, viii.

- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481(7381), 278-86.
- Taniguchi, N., Kawahara, K., Yone, K., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Goto, M., Inoue, K., Yamada, S., Ijiri, K., Matsunaga, S., Nakajima, T., Komiya, S. & Maruyama, I. (2003). High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 48(4), 971-81.
- Tardif, G., Reboul, P., Pelletier, J.P. & Martel-Pelletier, J. (2004). Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol* 14(3), 197-204.
- Umlauf, D., Frank, S., Pap, T. & Bertrand, J. (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci* 67(24), 4197-211.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A. & Tracey, K.J. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285(5425), 248-51.
- White, K.K., Hodgson, D.R., Hancock, D., Parry, B.W. & Cordell, C. (1989). Changes in equine carpal joint synovial fluid in response to the injection of two local anesthetic agents. *Cornell Vet* 79(1), 25-38.
- Visse, R. & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8), 827-39.
- Youn, J.H., Oh, Y.J., Kim, E.S., Choi, J.E. & Shin, J.S. (2008). High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol* 180(7), 5067-74.

## BILAGA 1

### Hästuppgifter för ledinflammationsprojekt

Datum: \_\_\_\_\_

Hästens namn: \_\_\_\_\_

Ras: \_\_\_\_\_

Kön: \_\_\_\_\_

Ålder: \_\_\_\_\_

Ägare/ryttare: \_\_\_\_\_

Tränare: \_\_\_\_\_

Hästens användningsområde: Dressyr ☐ Hoppning ☐ Fälttävlan ☐ Trav ☐ Övrigt \_\_\_\_\_

Tävlingsnivå, rid: Lätt klass ☐ Medelsvår ☐ Svår ☐ Promenadridning ☐ Unghäst ☐

Tävlingsnivå, trav; Antal starter senaste året: \_\_\_\_\_ Vinstsumma senaste året: \_\_\_\_\_ Ej startat: ☐

Sjukhistoria:

När tävlade hästen senast? Mindre än 1 månad sedan ☐ 6 mån sedan ☐ 1 år sedan ☐ tävlas ej ☐

Är hästen i träning? Full tävlings-/träningskondition ☐ Under igångsättning ☐ Helt i vila ☐

När kördes/reds/arbetades hästen senast? Senaste veckan ☐ 2 veckor sedan ☐ 3 veckor sedan ☐ 4 veckor sedan ☐ Längre än 4 veckor ☐ Aldrig arbetad ☐

Hur länge har hästen varit halt på detta ben? Om möjligt ange dagantal: \_\_\_\_\_ Mindre än 1 vecka ☐ mindre än 2 veckor ☐ 2-4 veckor, konstant halt ☐ 2-4 veckor, halt då och då ☐ 1 månad, konstant halt ☐ 1 månad, halt då och då ☐ Mer än 1 månads hälta ☐

Sedan hälтан upptäcktes, har den: förbättrats ☐ förvärrats ☐ oförändrat lika halt ☐

Tidigare diagnosticerad hälta från detta ben? Ja ☐ Nej ☐ Vet ej ☐

Om ja, hur länge sedan, diagnos och vilken klinik: \_\_\_\_\_

Har hästen fått behandling/injektion i någon led på detta ben de senaste 3 månaderna?

Ja ☐ vilken led? \_\_\_\_\_ Nej ☐ Vet ej ☐

Om ja, senast behandlad: \_\_\_\_\_ Preparat: \_\_\_\_\_

Har hästen fått allmänbehandling med antiinflammatoriskt preparat den senaste månaden?

Ja ☐ Nej ☐ Vet ej ☐ Om ja, senast behandlad: \_\_\_\_\_ Preparat och dosering: \_\_\_\_\_

Annan behandling t ex. naturmedelspreparat, laser? Ja ☐ Nej ☐ Vet ej ☐

Om ja, med vad: \_\_\_\_\_

Om ja, senast behandlad: \_\_\_\_\_

Tack för din medverkan!



## BILAGA 2

### Provinsamling artroskopi

Hästens namn: \_\_\_\_\_

Led: \_\_\_\_\_

Allt material överförs till respektive rör så fort som möjligt samt hanteras **sterilt**. Efter provtagning förvaras proverna i kylskåp.

Prov			Kommentar/gradering
<b>Blodprov</b> Från permanentkanyl i samband med sövning	5-10 ml i serumrör (helst 2 rör)		
<b>Ledvätska</b>	0.5-1 ml i litet EDTA rör	Resten i serumrör	
<b>Ledkapsel</b> Två bitar	En bit i Formalin	En bit i RNAlater (Kontrollera att biten täcks av vätska)	
<b>Chip fragment</b> Delas i två delar	En del i Formalin	En del i RNAlater (Kontrollera att biten täcks av vätska)	

**Övriga kommentarer (markeringar kan göras på skissen):**

### Gradering ledkapsel:

0 = u.a.

1 = akut lindrig (mild hyperemi, +/- ödem, inga blödningar eller fibrin)

2 = akut måttlig (måttlig hyperemi, +/- ödem, sparsam förekomst av fibrin och/eller blödningar)

3 = akut kraftig (måttlig-kraftig hyperemi, omfattande förekomst av fibrin och/eller blödningar, +/- ödem)

4 = kronisk (ingen eller mild hyperemi, hypertrofierade villi)

### Gradering ledbrosk carpus:

0 = u.a.

1 = Very superficial erosion with articular cartilage swelling

2 = Partial-thickness erosion

3 = Partial- and full-thickness erosion

4 = Extensive full-thickness erosion to the level of subchondral bone

### Gradering ledbrosk kotled (wear lines):

0 = u.a.

1 = 1 or 2 partial-thickness wear lines/joint surface

2 = 3-5 partial-thickness or 1-2 full-thickness wear lines/joint surface

3 = > 5 partial-thickness or > 2 full-thickness wear lines/joint surface

### Gradering ledbrosk kotled (erosions):

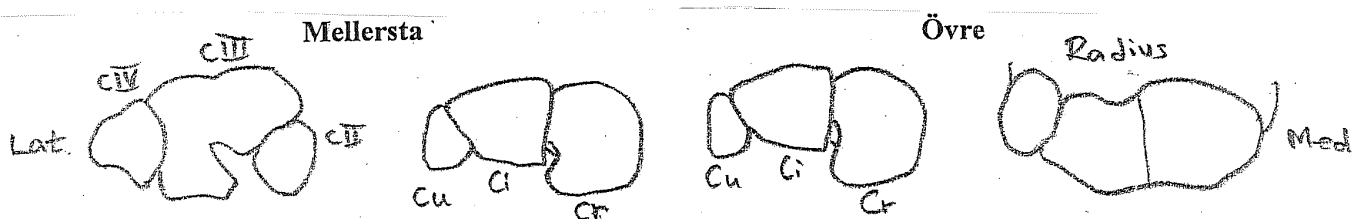
0 = u.a.

1 = Partial-thickness erosion, < 5 mm in diameter

2 = Partial-thickness erosion, > 5 mm in diameter

3 = Full-thickness erosion

### Carpus:



### Kotled:

